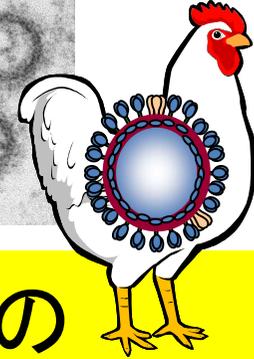
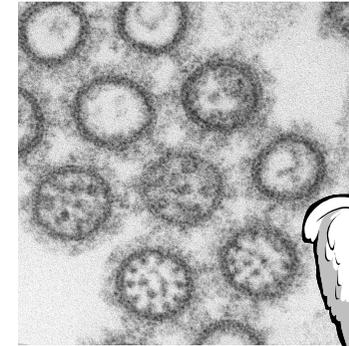
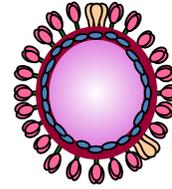
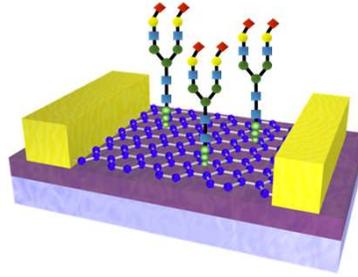


グラフェンバイオセンサによる 高病原性インフルエンザウイルスの ヒト感染性の検出

大阪大学 : 松本和彦 小野堯生 金井康 井上恒一
中部大学/香川大学 : 河原敏夫 鈴木康夫 平松宏明 中北慎一
京都府立医科大学 : 渡邊洋平
村田製作所 : 木村雅彦 牛場翔太 宮川成人 品川歩 岡優果

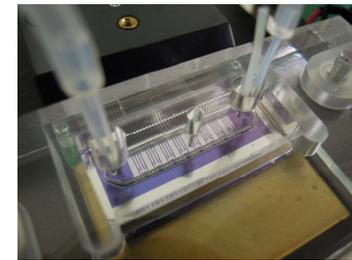
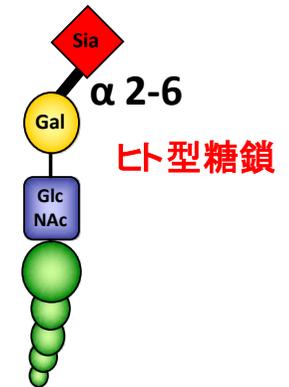
目的



1) 高病原性の鳥インフルエンザウイルスの
ヒト感染性を迅速にOn site 診断する装置開発

2) ウイルスの薬剤耐性のその場判定

3) 新型コロナウイルスへの応用展開



内容

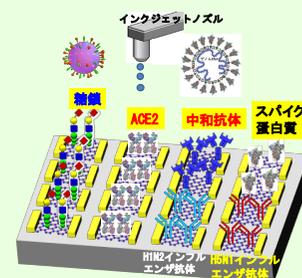
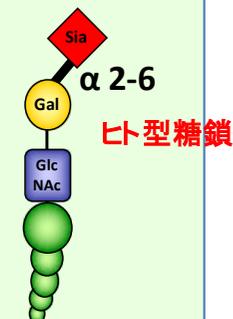
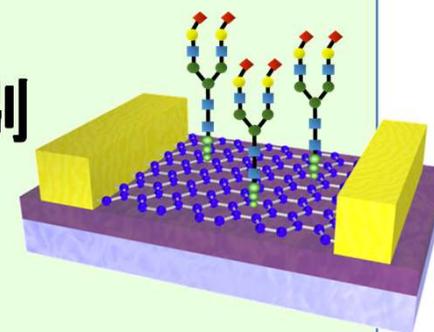
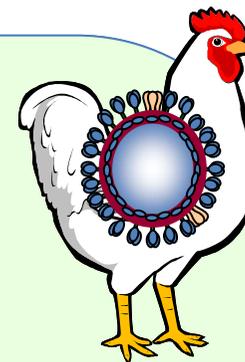
1. 背景：鳥インフルエンザの脅威と問題点

2. グラフェンFETによるヒト感染性の判別

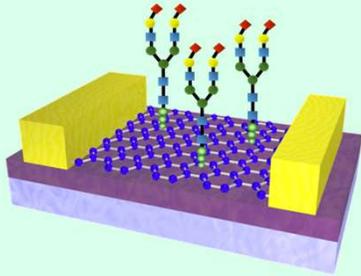
3. グラフェンFETによる薬剤評価の開発

4. 今後の展開

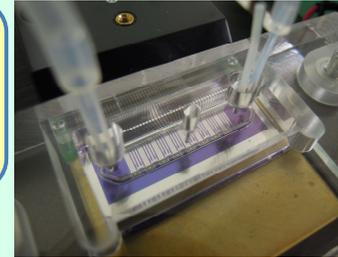
- ・ 多項目、簡易診断システムへの展開
- ・ 新型コロナウイルスへの展開



研究協力体制

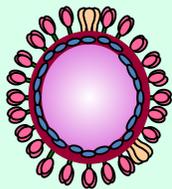
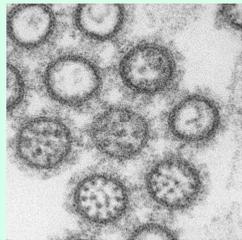


大阪大学
電子デバイスの専門



様々な電子デバイスの作成と
系の統合、システム化を行う

京都府立医科大学
ウイルスの専門



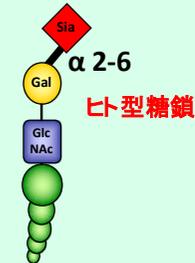
最新ウイルスの不活化と
糖鎖結合機序の解明



中部大学・香川大学
糖鎖の専門



最適糖鎖の合成とウイルスと
の結合力を観察



村田製作所
社会実装へ

muRata
INNOVATOR IN ELECTRONICS



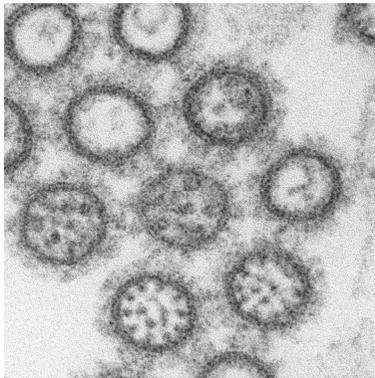
背景：インフルエンザウイルスの世界流行

周期的に繰り返される高病原性鳥インフルエンザウイルスのパンデミック

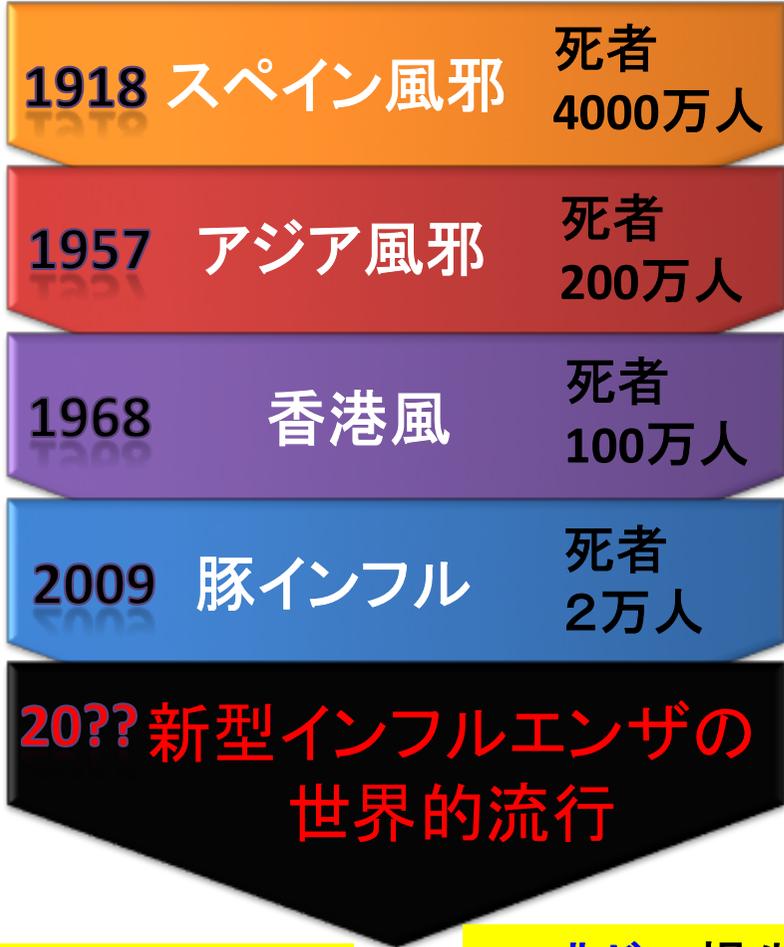
致死率60%



National Museum of Health and Medicine US, NCP 001003



鳥インフルエンザウイルス (H5N1)の電子顕微鏡写真



想定死者5000万人

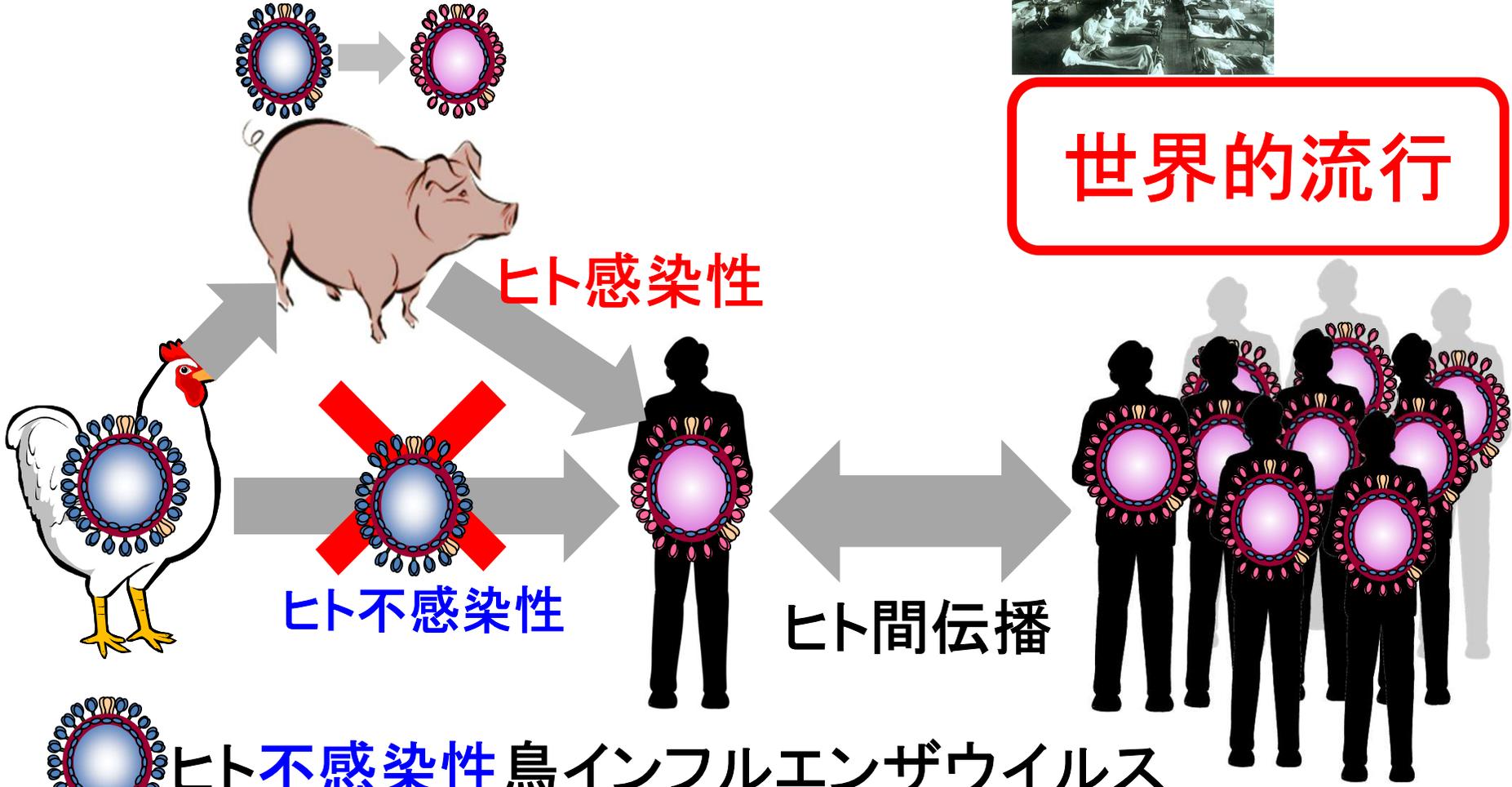
3.6兆ドル損失予測 (世界GDPの5%)

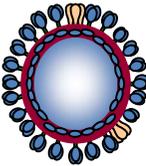


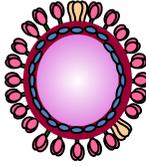
研究背景



世界的流行



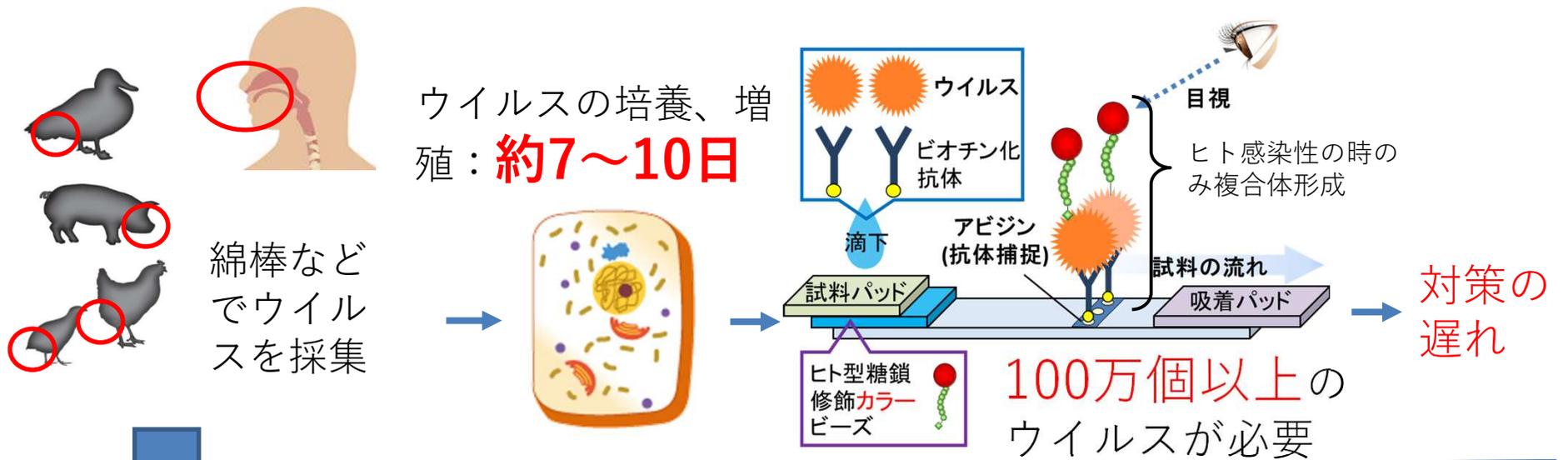
 ヒト不感染性鳥インフルエンザウイルス

 ヒト感染性鳥インフルエンザウイルス

両者の判別は極めて困難

- ・1ウイルスからの爆発的な増殖。
- ・ヒト感染性の新ウイルスが突如出現

ヒト感染性を指標としたウイルス検出の超高感度化



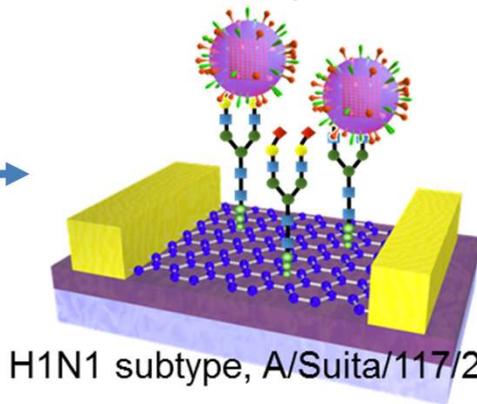
採取ウイルスを直接 **数分** で検出 → 迅速なパンデミック阻止

ウイルス液1滴

ヒト型IFV, 結合性有

特長

1. 超高感度：ウイルス 10~100個
2. 超高速：ウイルス培養不要

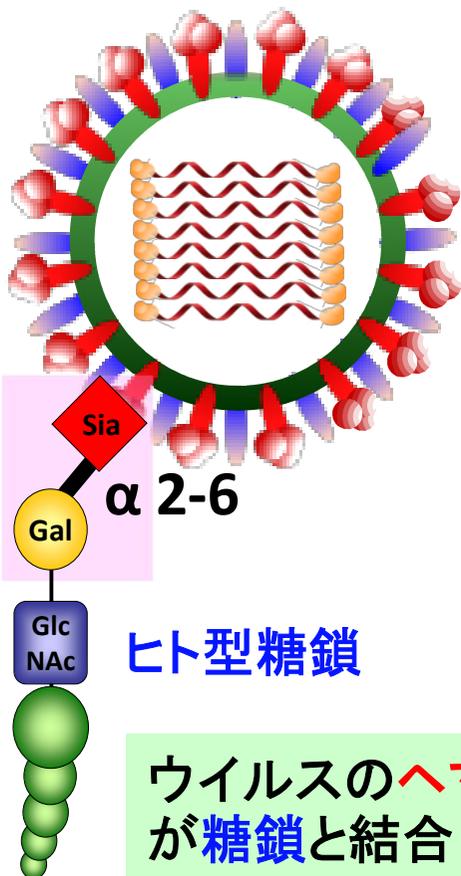
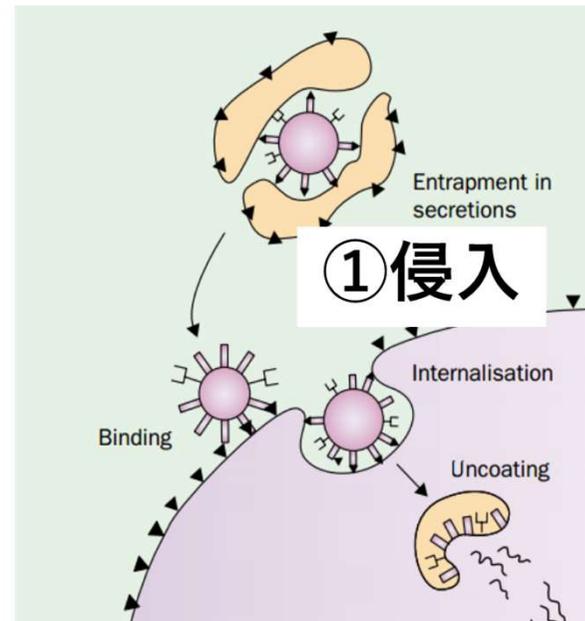
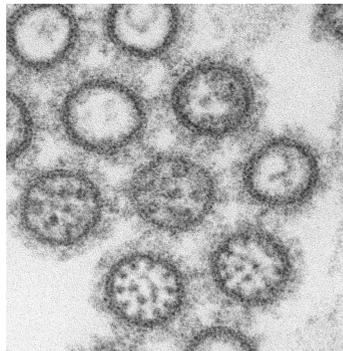


1. **人感染性と薬剤耐性**
2. **亜型確定**

インフルエンザ ウイルス

- H  **ヘマグルチニン**
- N  **ノイラミニダーゼ**

鳥インフルエンザウイルス (H5N1)

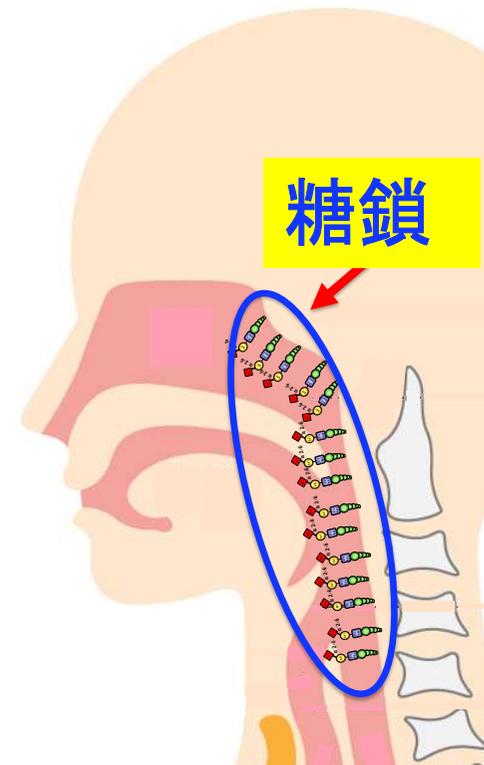
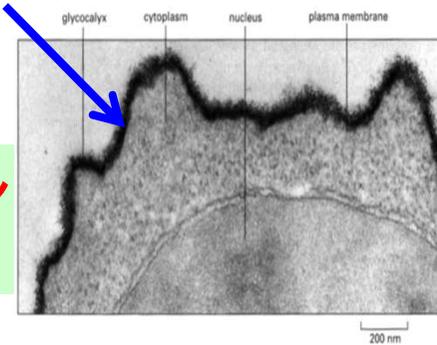


 **ヘマグルチニン**

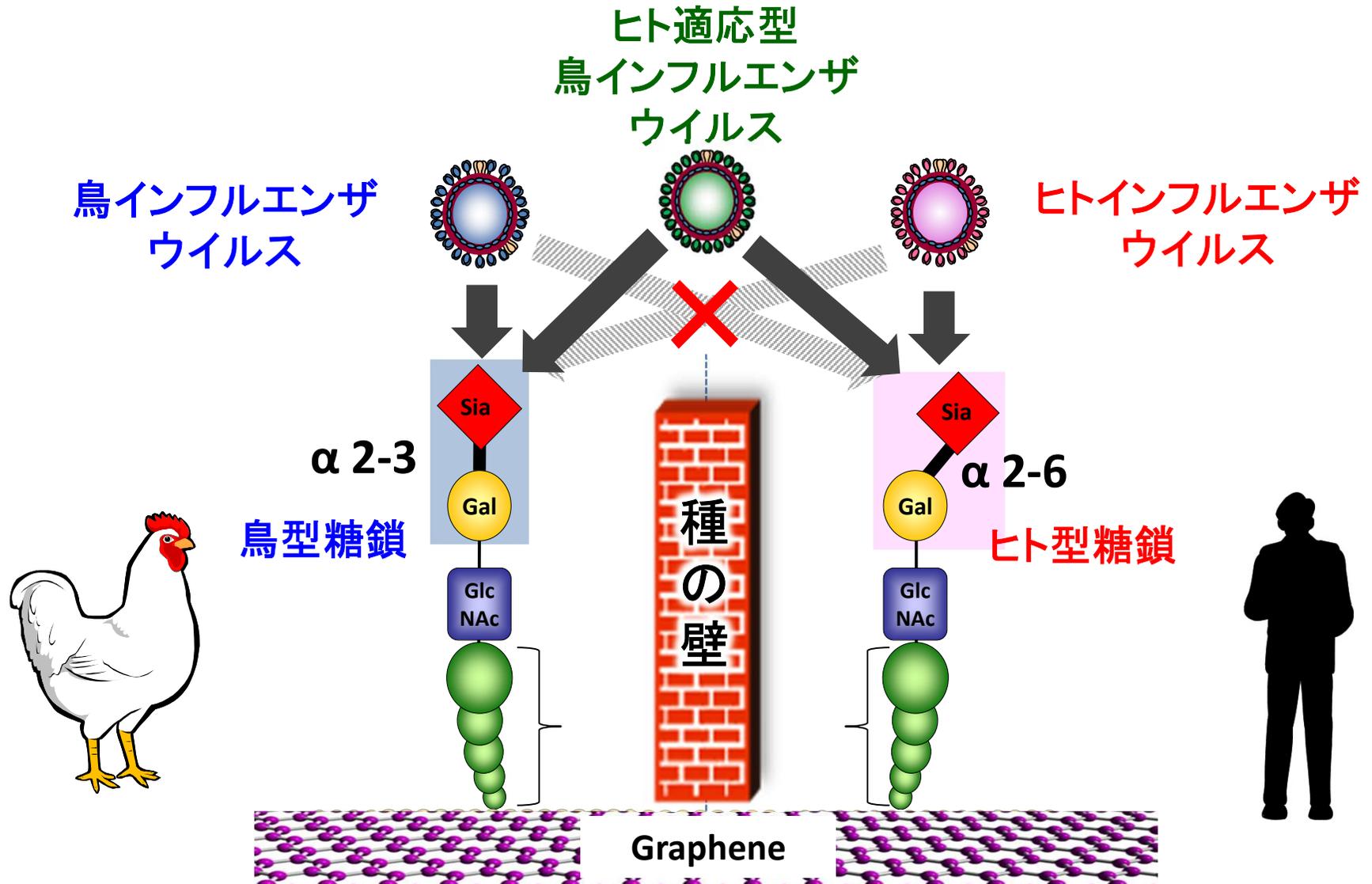
糖鎖

ヒト型糖鎖

ウイルスのヘマグルチニンが**糖鎖**と結合



インフルエンザウイルスと糖鎖

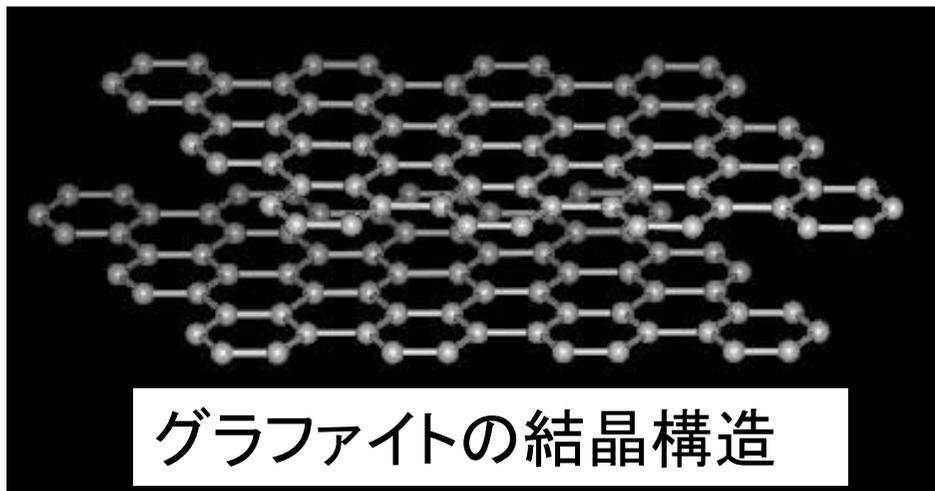


グラフェンとは

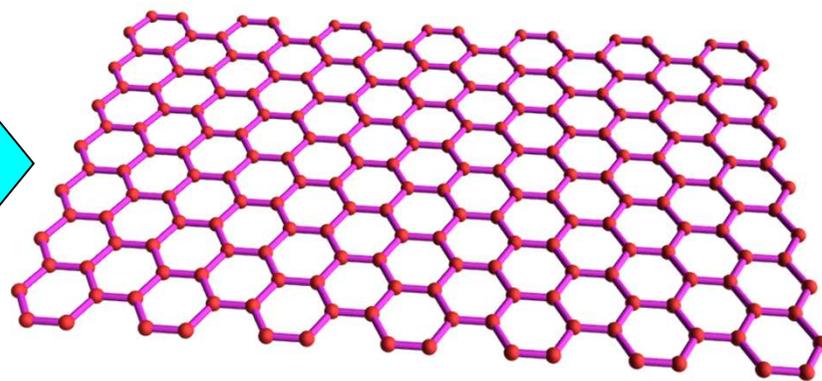
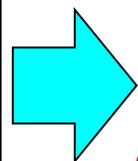


グラファイト 黒鉛

層状のグラファイトから
一層のグラフェンへ



・分子間力で弱く結合

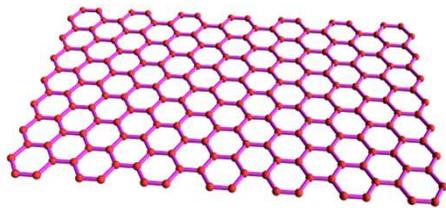
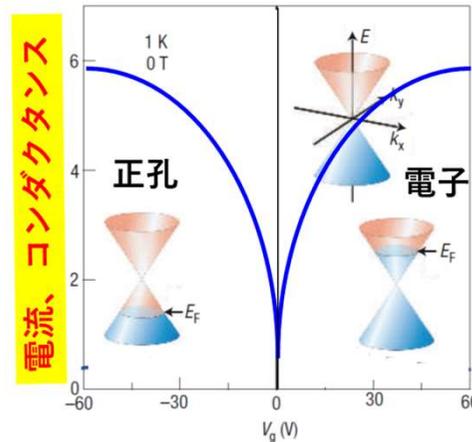


グラフェン

グラフェンの特長

- 高い移動度 $\mu = 200,000 \text{cm}^2/\text{Vs}$
- 2次元電子ガスが表面露出
- アンビポーラ特性
- 容易に表面修飾可能

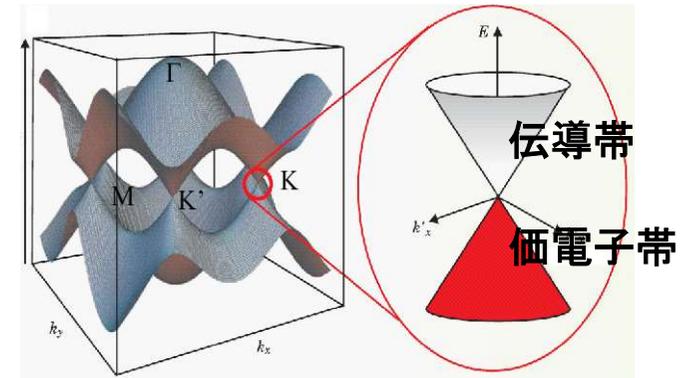
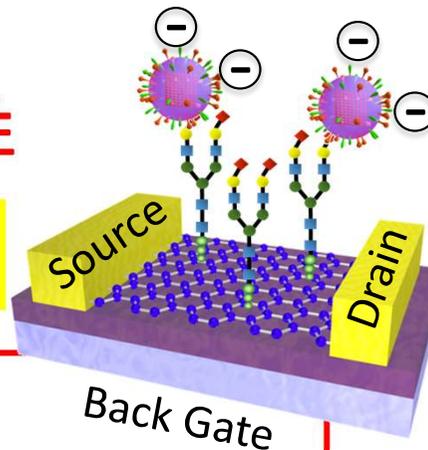
高感度特性



グラフェンFETの高感度特性

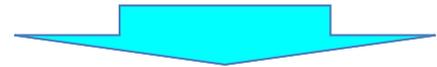
$$g_m = z \mu C_i (V_G - V_T) / 2L$$

- μ : 10~100倍
- C_i : 10~100倍 電気2重層がゲート絶縁膜



K点付近で分散関係が線形

$$E = \hbar v_F k$$



電子の有効質量~0!!

$$m_e^* = d^2 E / dk^2$$



シリコンの100倍~1,000倍

移動度 $\mu = 200,000 \text{cm}^2/\text{Vs}$

内容

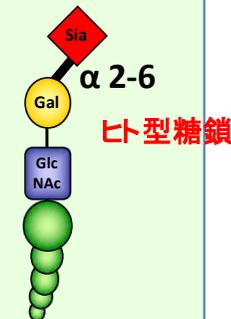
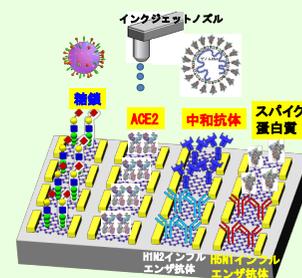
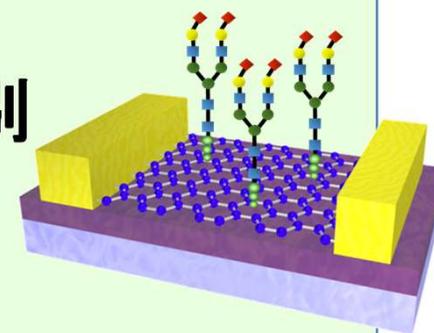
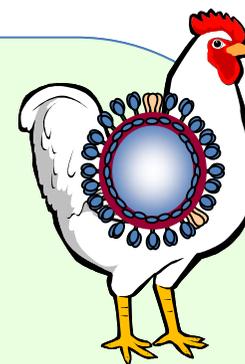
1. 背景：鳥インフルエンザの脅威と問題点

2. グラフェンFETによるヒト感染性の判別

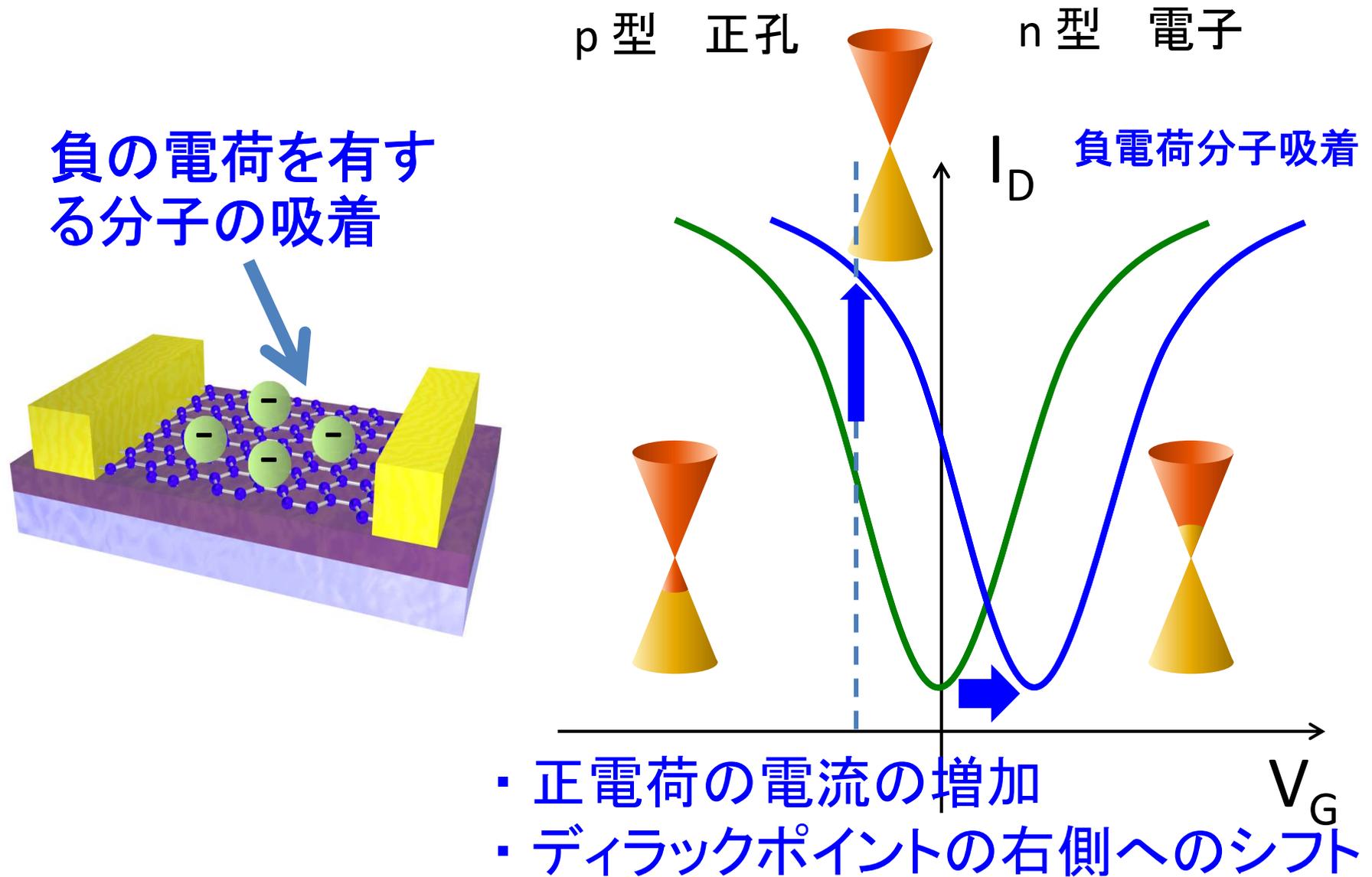
3. グラフェンFETによる薬剤評価の開発

4. 今後の展開

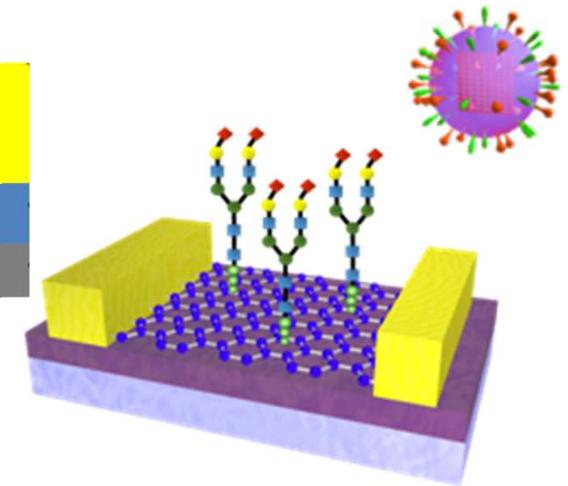
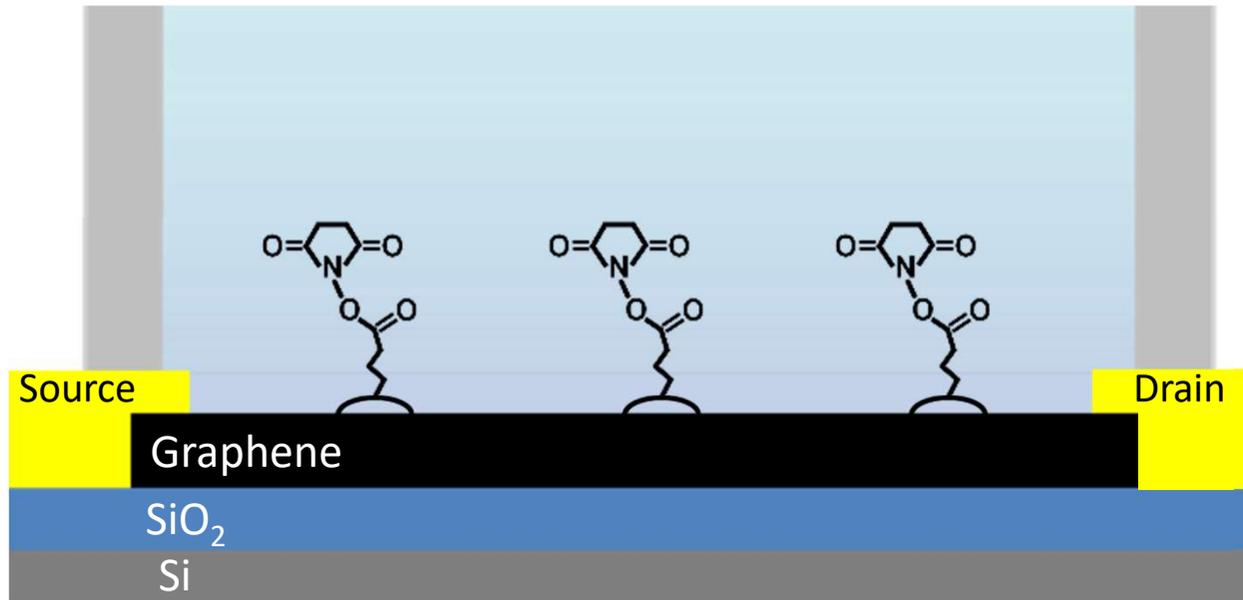
- ・ 多項目, 簡易診断システムへの展開
- ・ 新型コロナウイルスへの展開



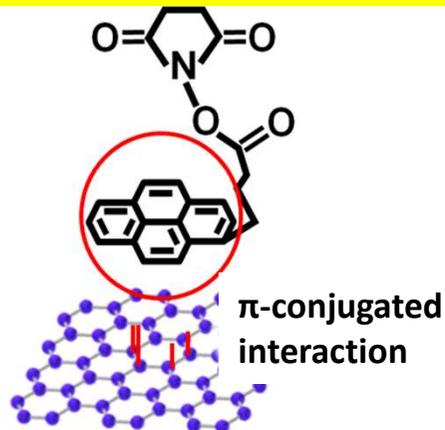
グラフェンFET バイオセンサーの原理



ウイルス選択性を持たせる為にグラフェンに糖鎖を修飾

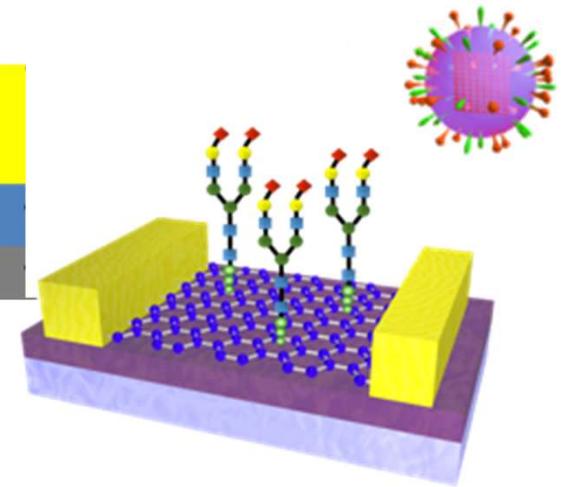
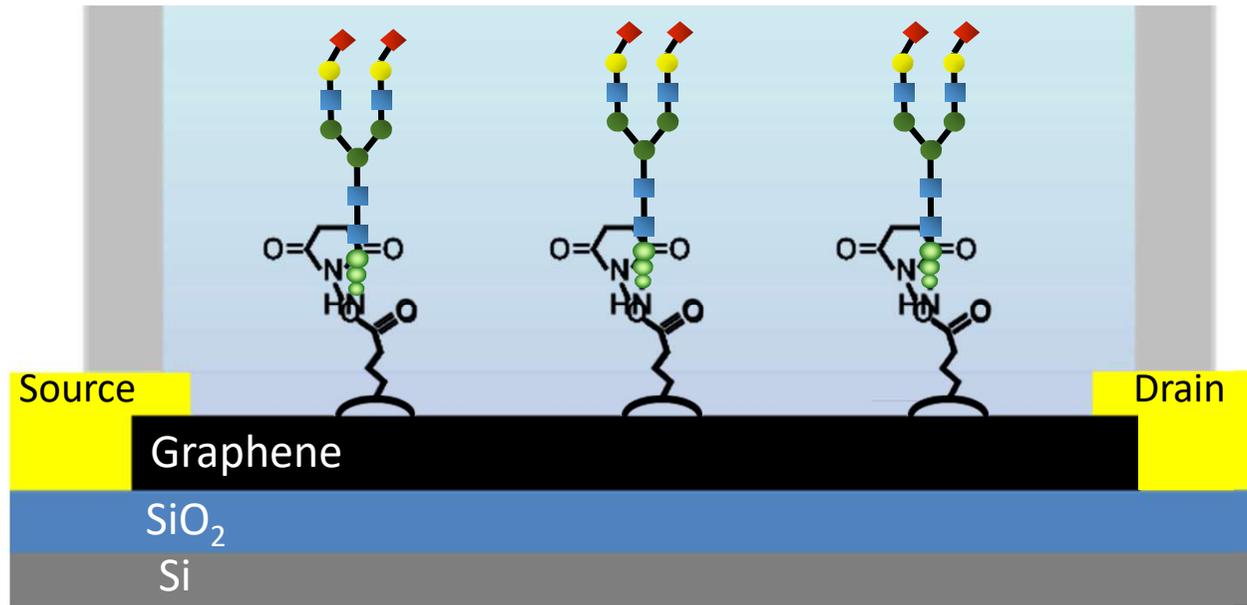


1-ピレンブタン酸, スクシンイミジルエステル

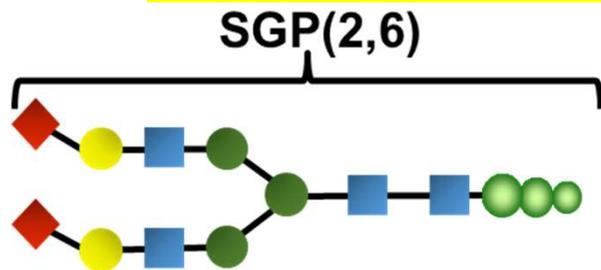


- π 結合によってグラフェン上に結合
- グラフェンのバンド構造は不変

ウイルス選択性を持たせる為にグラフェンに糖鎖を修飾



Glycan: 糖鎖:シアリルグリコペプチド(SGP)

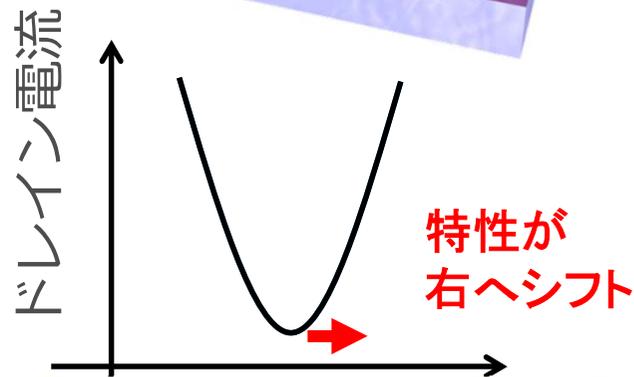
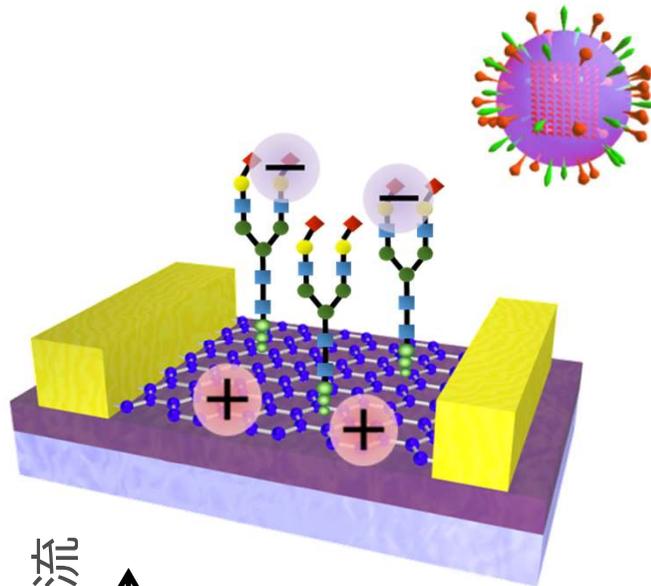


糖鎖の固定化

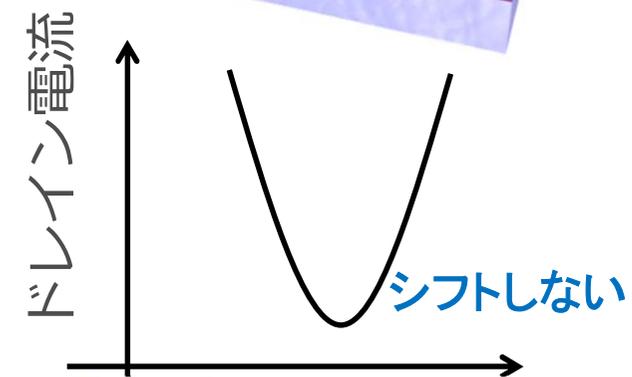
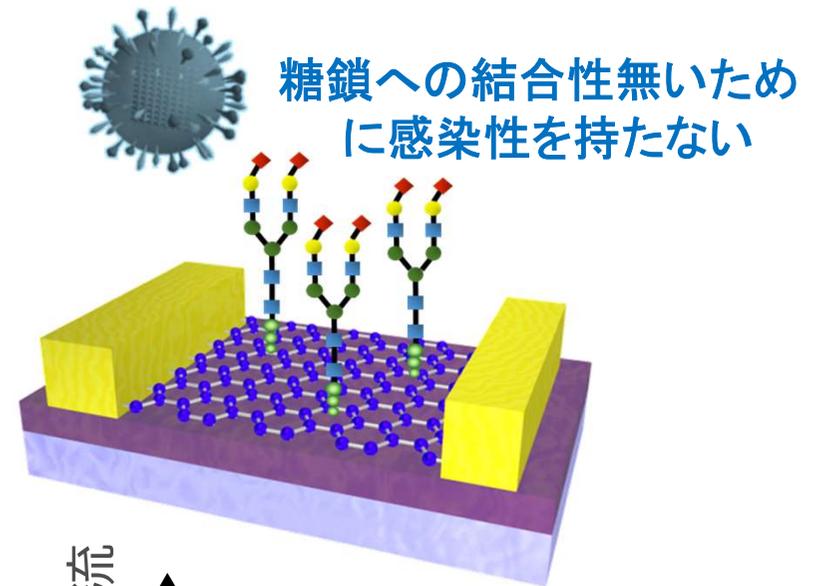
- 糖鎖:シアリルグリコペプチド(SGP)を8時間浸潤して固定化

糖鎖修飾グラフェンFETによるインフルエンザウイルスのヒト感染性鑑別

ヒト感染性IFV

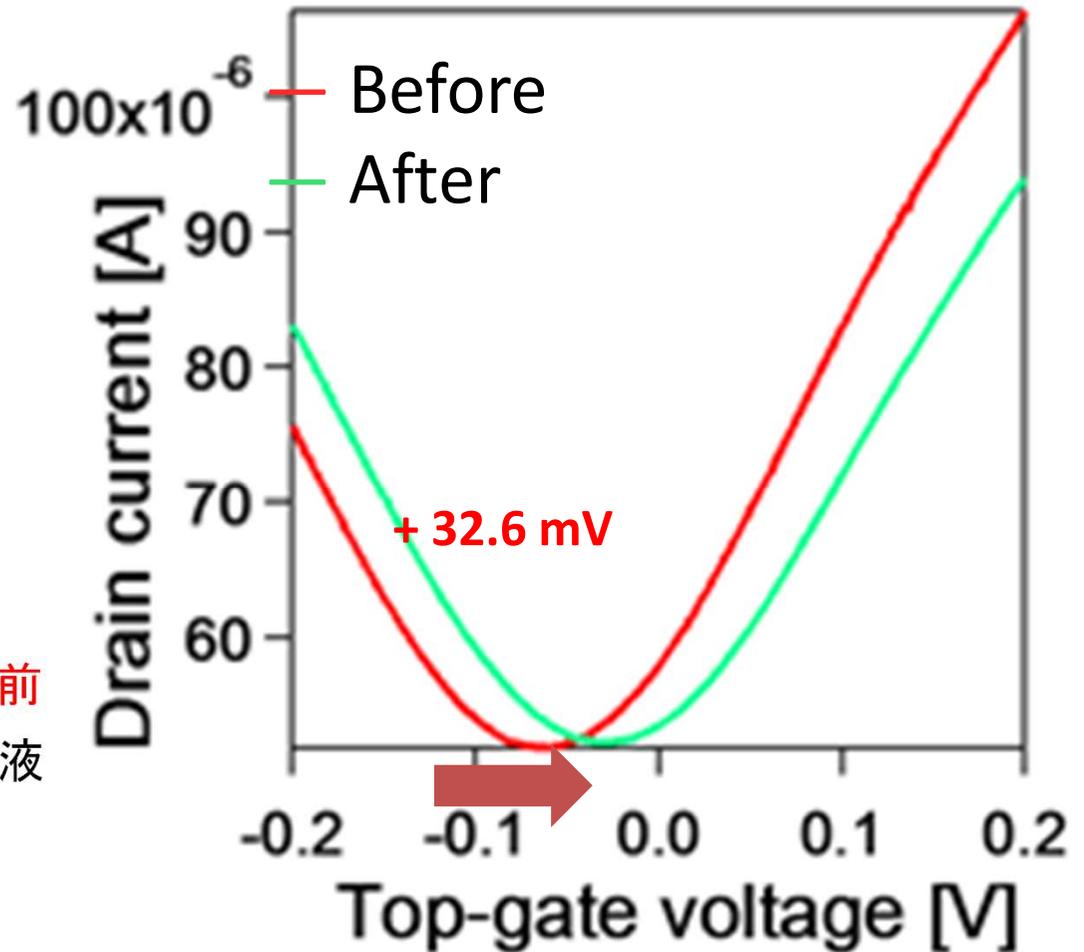
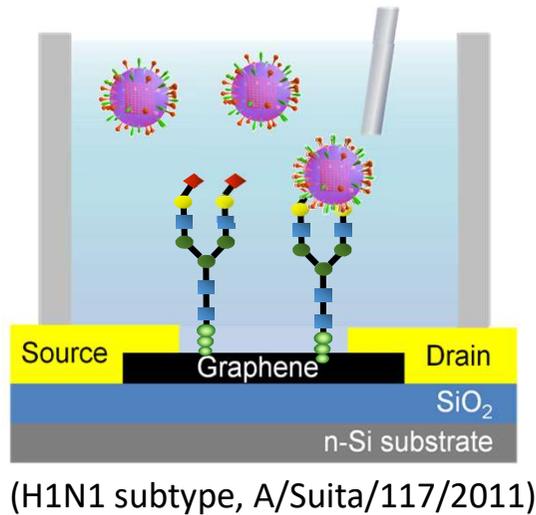


非ヒト感染性IFV



糖鎖修飾グラフェンFETによる
インフルエンザウイルスのヒト感染性の鑑別

糖鎖修飾グラフェンFETによるウイルス検知

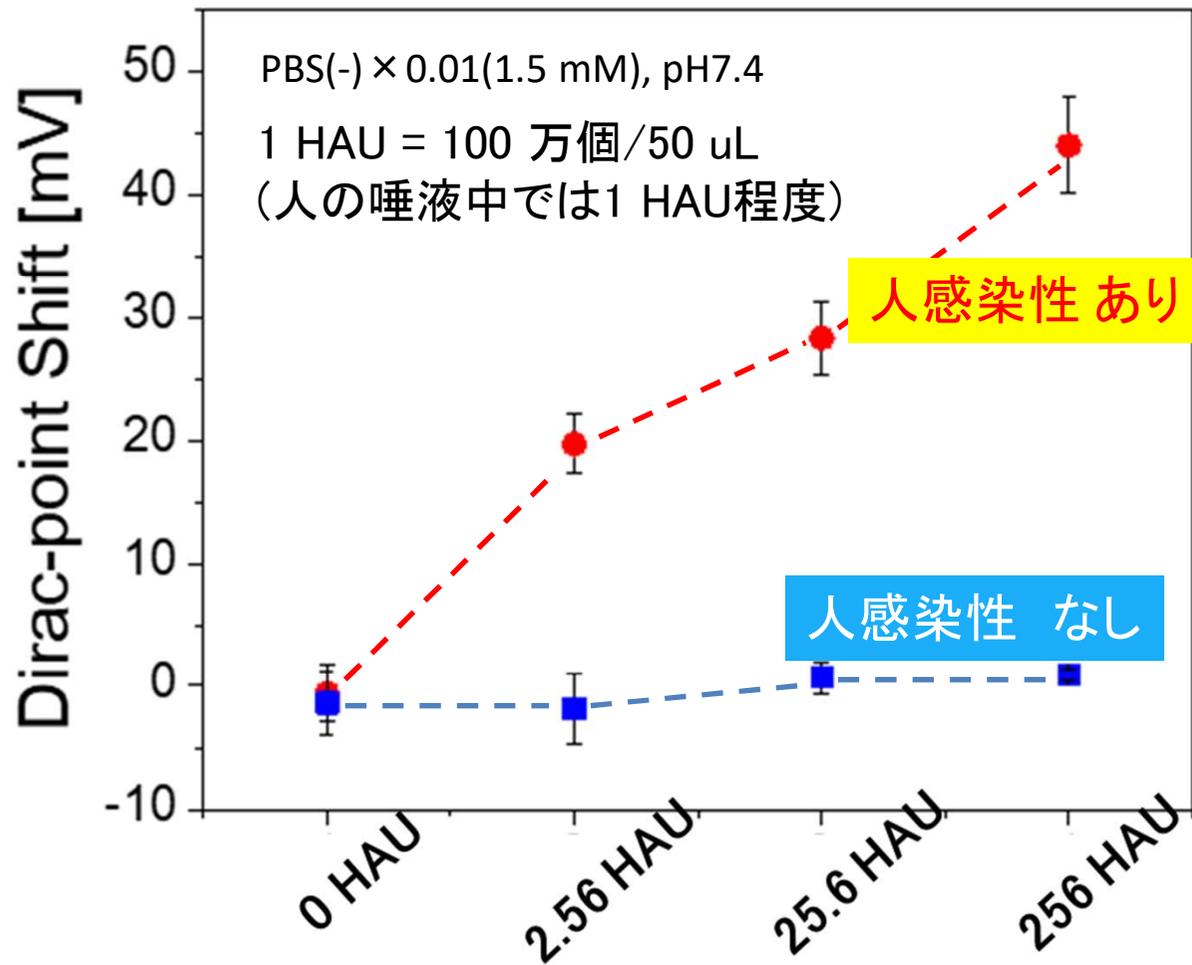


- ① 1.5 mM リン酸緩衝液 ウィルス導入前
- ② ウィルス導入 in 150 mM リン酸緩衝液 20分
- ③ 1.5 mM リン酸緩衝液 計測時

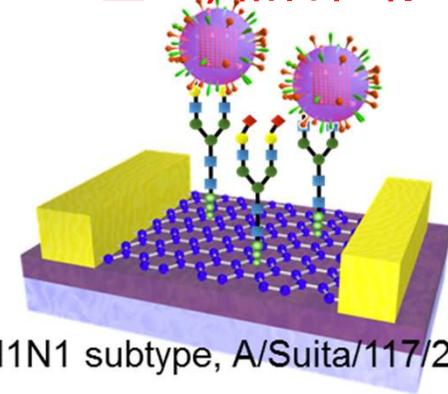
➤ Diracポイント: 32.6 mV シフト

20分でウィルス検出 ➡ 従来の方法より遥かに高速

ウイルスの**人感染性**を高感度に検出

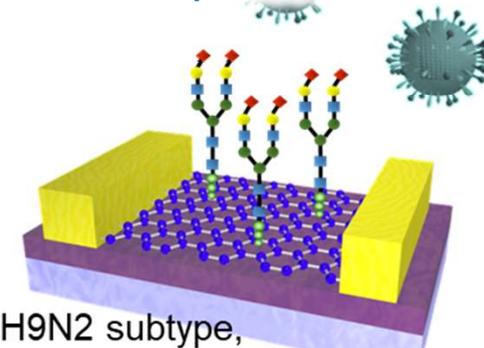


ヒト型IFV, 結合性有



H1N1 subtype, A/Suita/117/2011

鳥型IFV, 結合性無



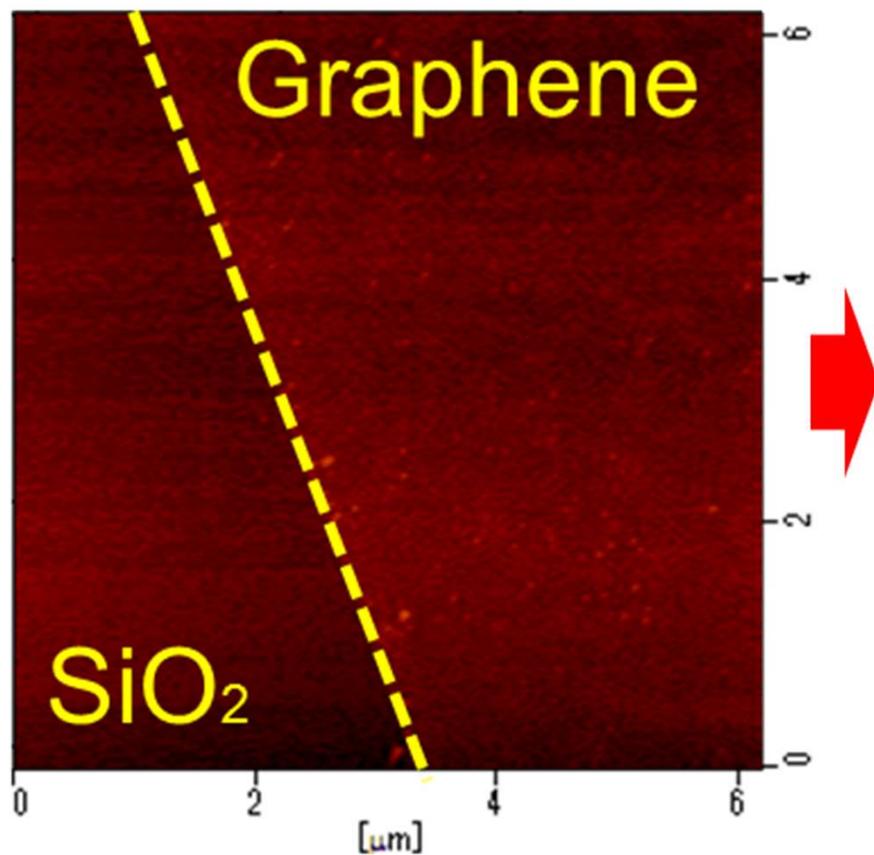
H9N2 subtype, A/Turkey/Wisconsin/1/1966

ヒト型ウイルスのみが糖鎖に結合

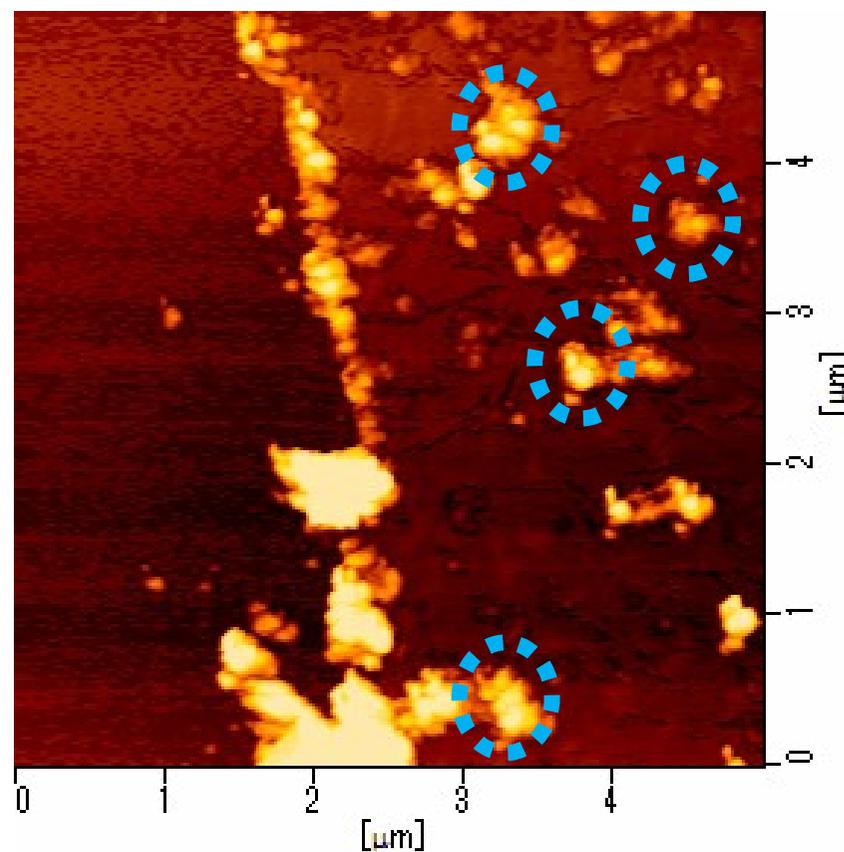
グラフェンFETによる感染性鑑別に成功

糖鎖修飾グラフェンFETによるウイルス検出 AFM測定

ウイルス導入前

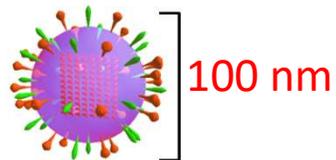
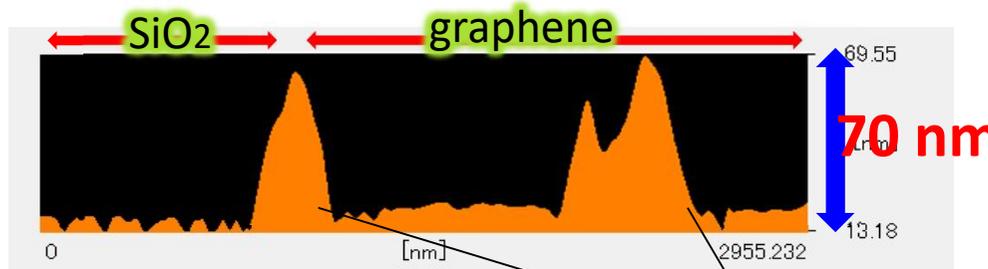


ウイルス導入後



糖鎖修飾グラフェンFETによるウイルス検出 AFM測定

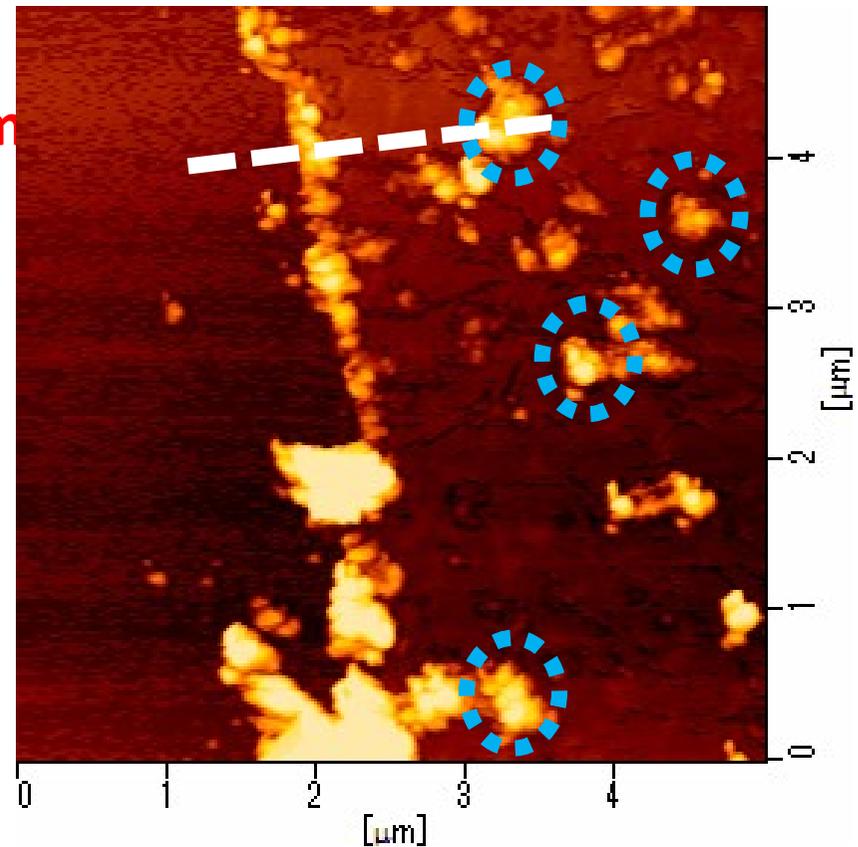
ウイルス結合 後 : AFM測定



結合したウイルス

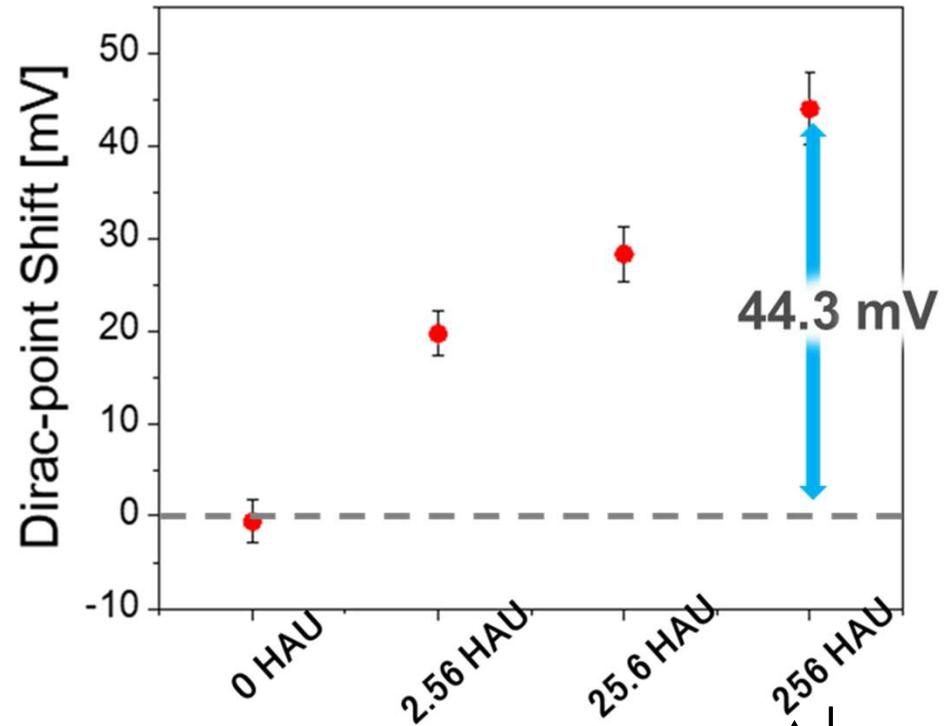
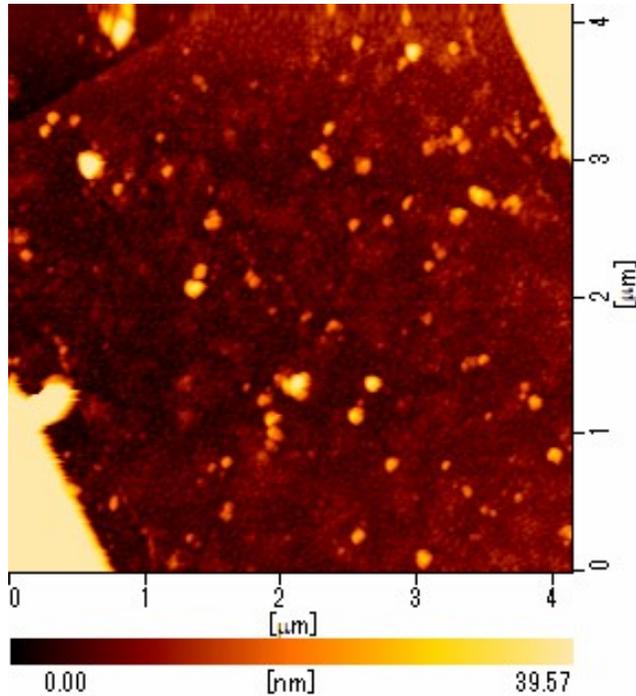
AFM測定は大気中測定のために
高さが異なると考えられる。

- インフルエンザウイルスがグラフェン
表面に結合した事を確認



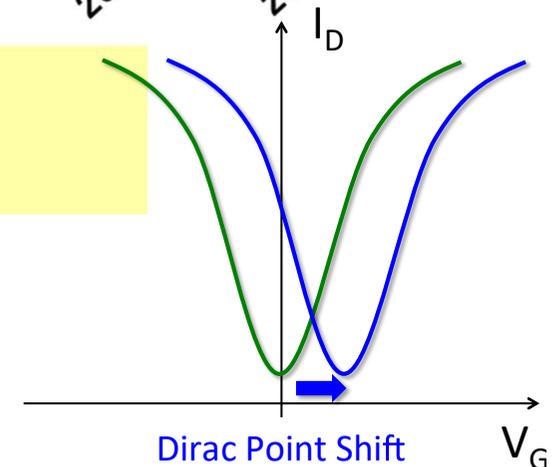
AFM像からグラフェンチャンネル上のウイルスの
全数は ~120 個

ウイルス1つあたりのシフト量見積もり



➤ AFM像の粒子数解析によりグラフェンチャンネル上の
ウイルス数 **~120個**

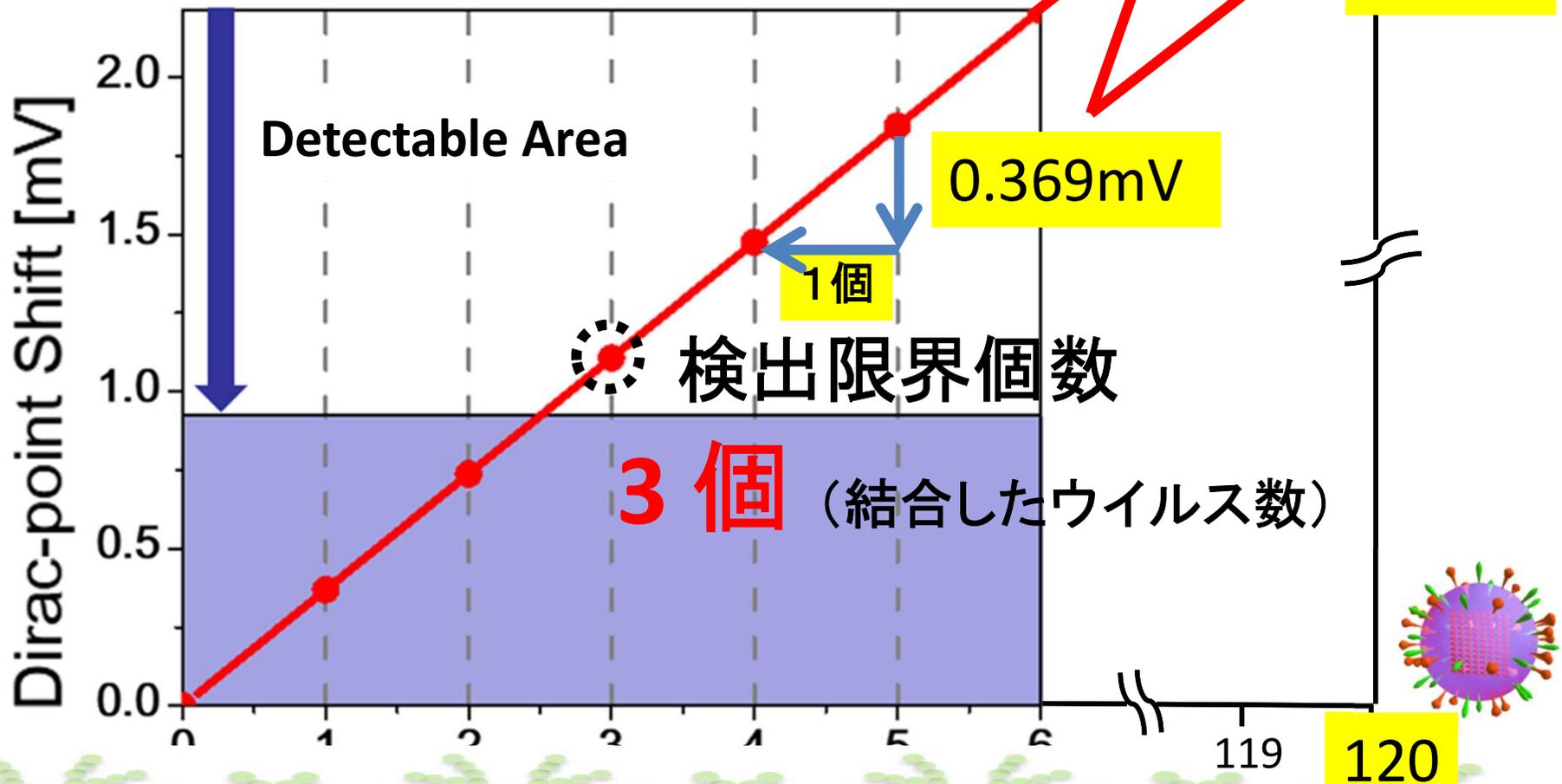
➤ ウイルス一つあたりのシフト量
~ 0.369 mV = 44.3mV / 120個



糖鎖機能化グラフェンFETによる インフルエンザウイルスの検出感度評価

➤ ウイルス一つあたりのシフト量
~ **0.369 mV**

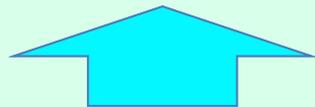
➤ 今回の系でのノイズレベル
~ **0.924 mV** [$3 \times (\text{ノイズのS.D.})$]



グラフェンFETはウイルス数個の結合を検出可能

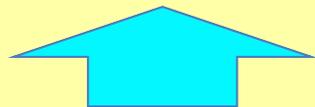
得られたポイント

1) **数個～100個**のウイルスで測定可能

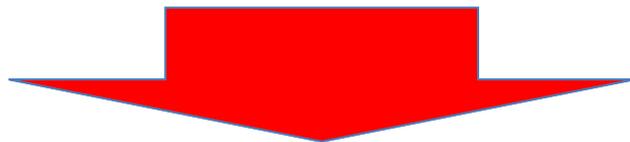


従来の**100～1,000倍**の高感度

2) **～20分程度**で人への**感染性**を確定可能(培養不要)

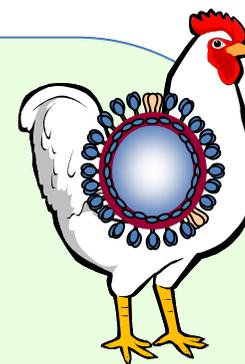


従来は**1週間～10日**必要(培養の為)



迅速その場診断へ

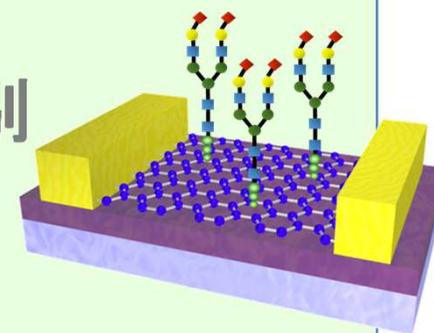
内容



1. 背景：鳥インフルエンザの脅威と問題点

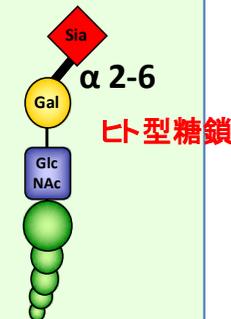
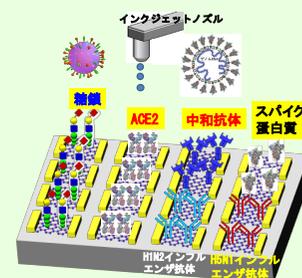
2. グラフェンFETによるヒト感染性の判別

3. グラフェンFETによる**薬剤評価**の開発

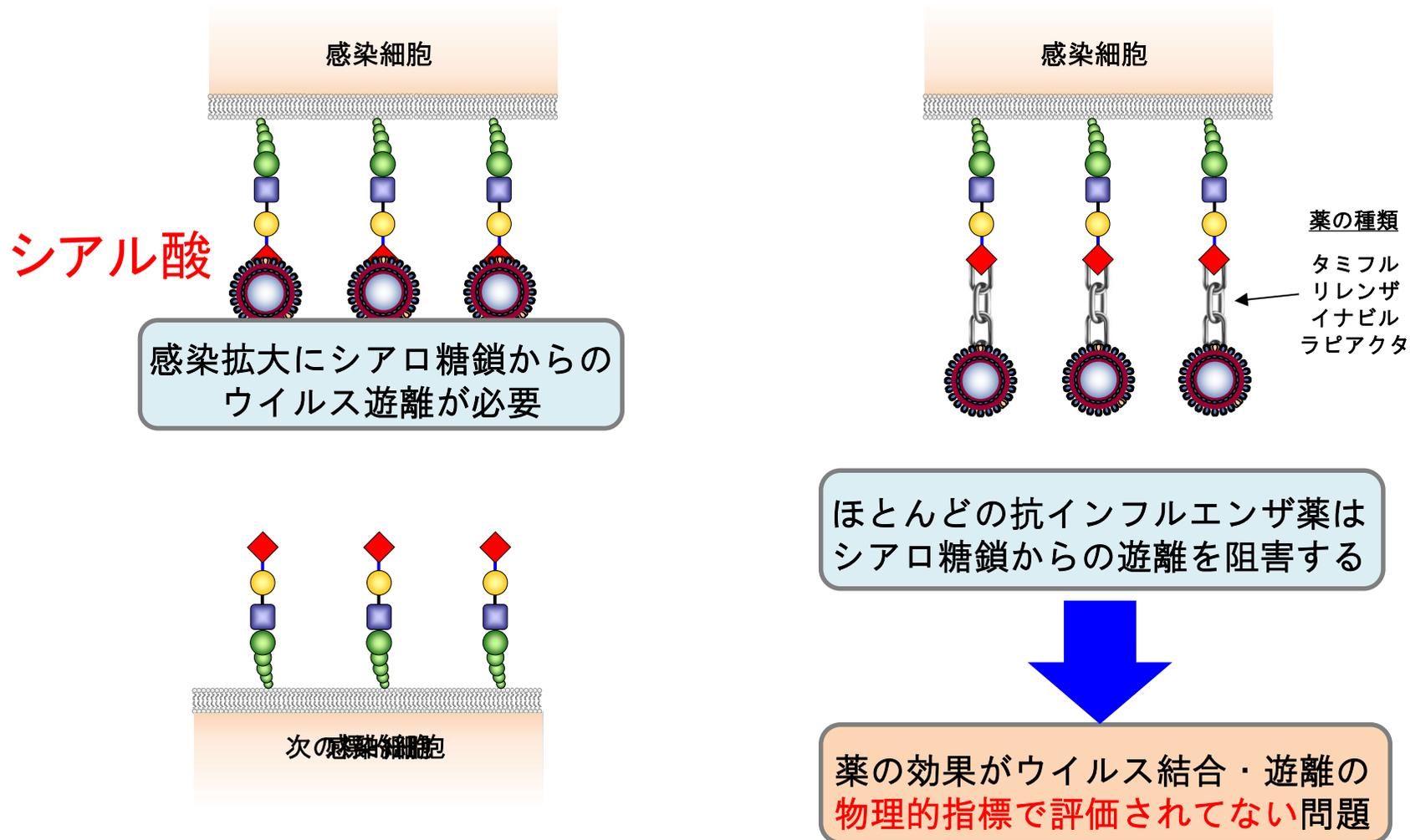


4. 今後の展開

- ・ 多項目, 簡易診断システムへの展開
- ・ 新型コロナウイルスへの展開



抗インフルエンザ薬の評価系の問題点



インフルエンザの感染メカニズムと治療薬

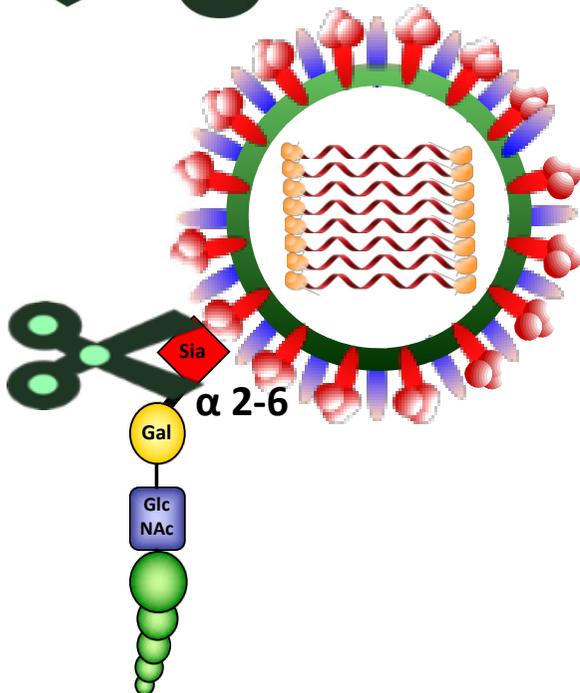
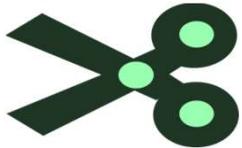
インフルエンザウイルス



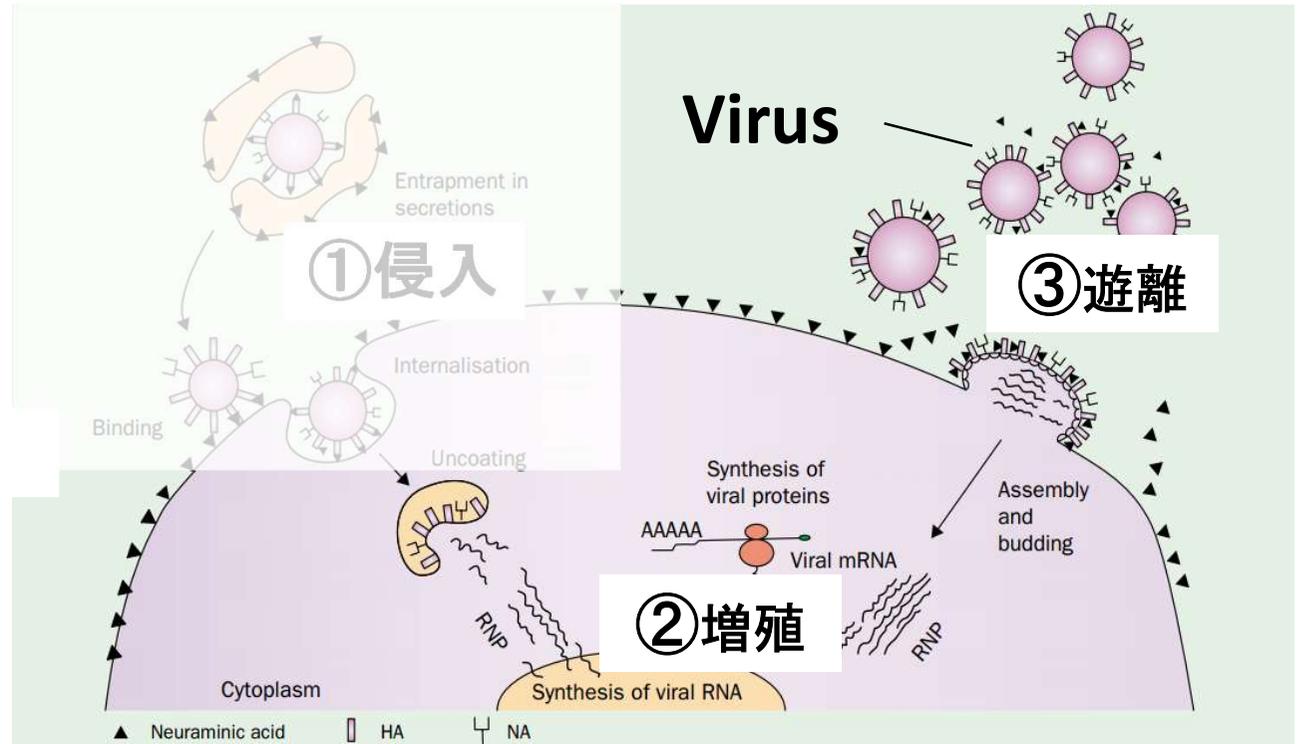
ヘマグルチニン



ノイラミニダーゼ



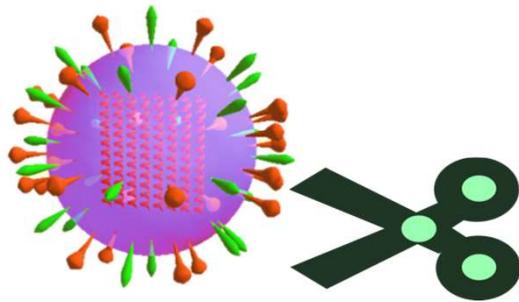
感染メカニズム



Larisa V Gubareva *et. al.*, *THE LANCET* 355, 827 (2000)

インフルエンザの感染メカニズムと治療薬

インフルエンザウイルス



: ノイラミニダーゼ

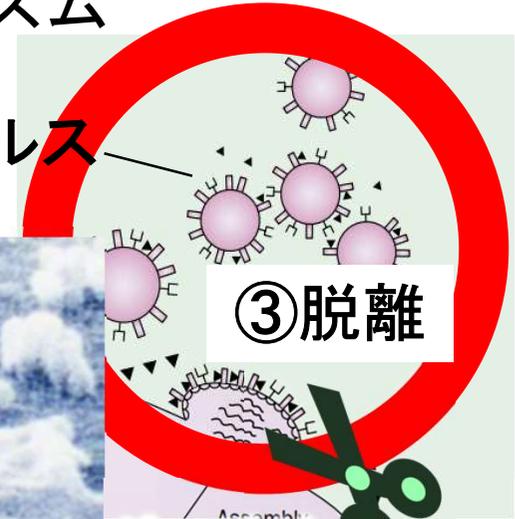
インフルエンザの感染メカニズム

ウイルス

ウイルスが脱離する様子



ノイラミニダーゼが
細胞とウイルスを切り離す



Larisa V Gubareva et. al., THE LANCET 355, 827 (2000)



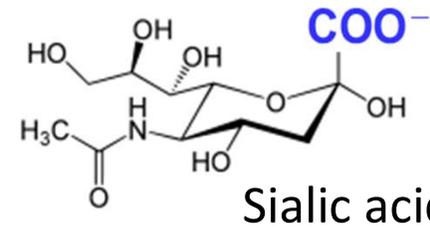
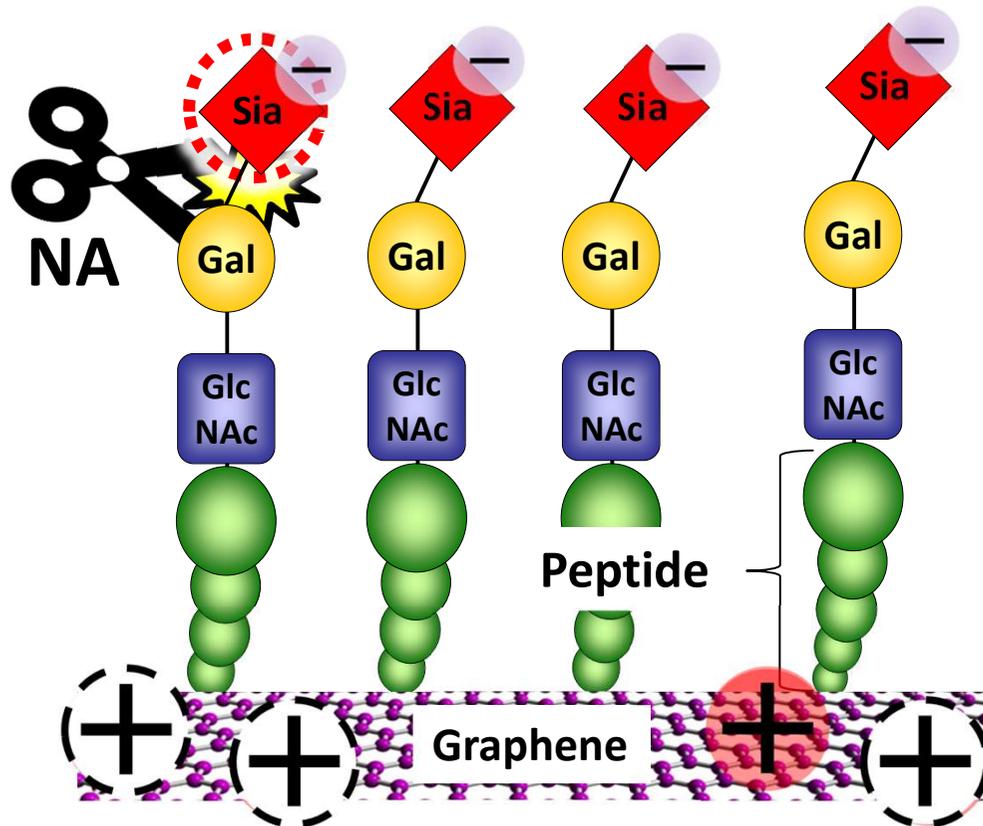
タミフル®



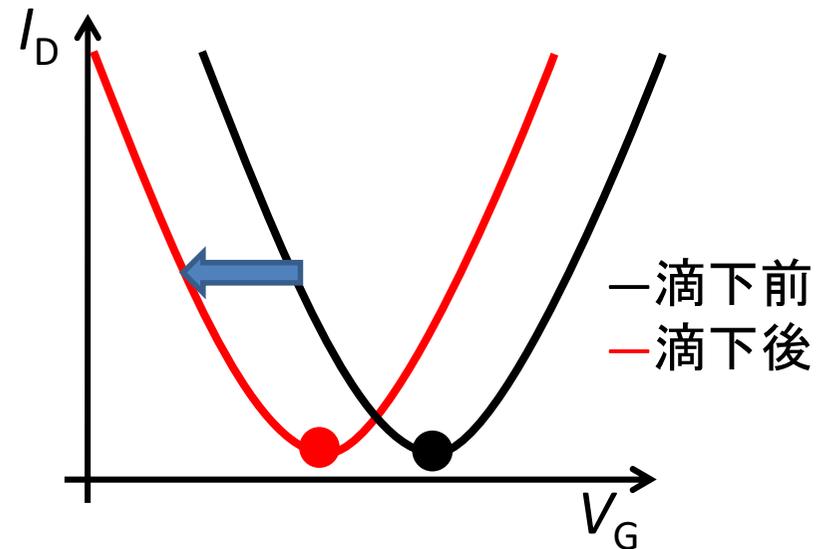
リレンザ®

変異によって生じる**新型ウイルス**や、**薬剤耐性のあるウイルス**への対応が**必要**

糖鎖機能化G-FETを用いたNA反応計測

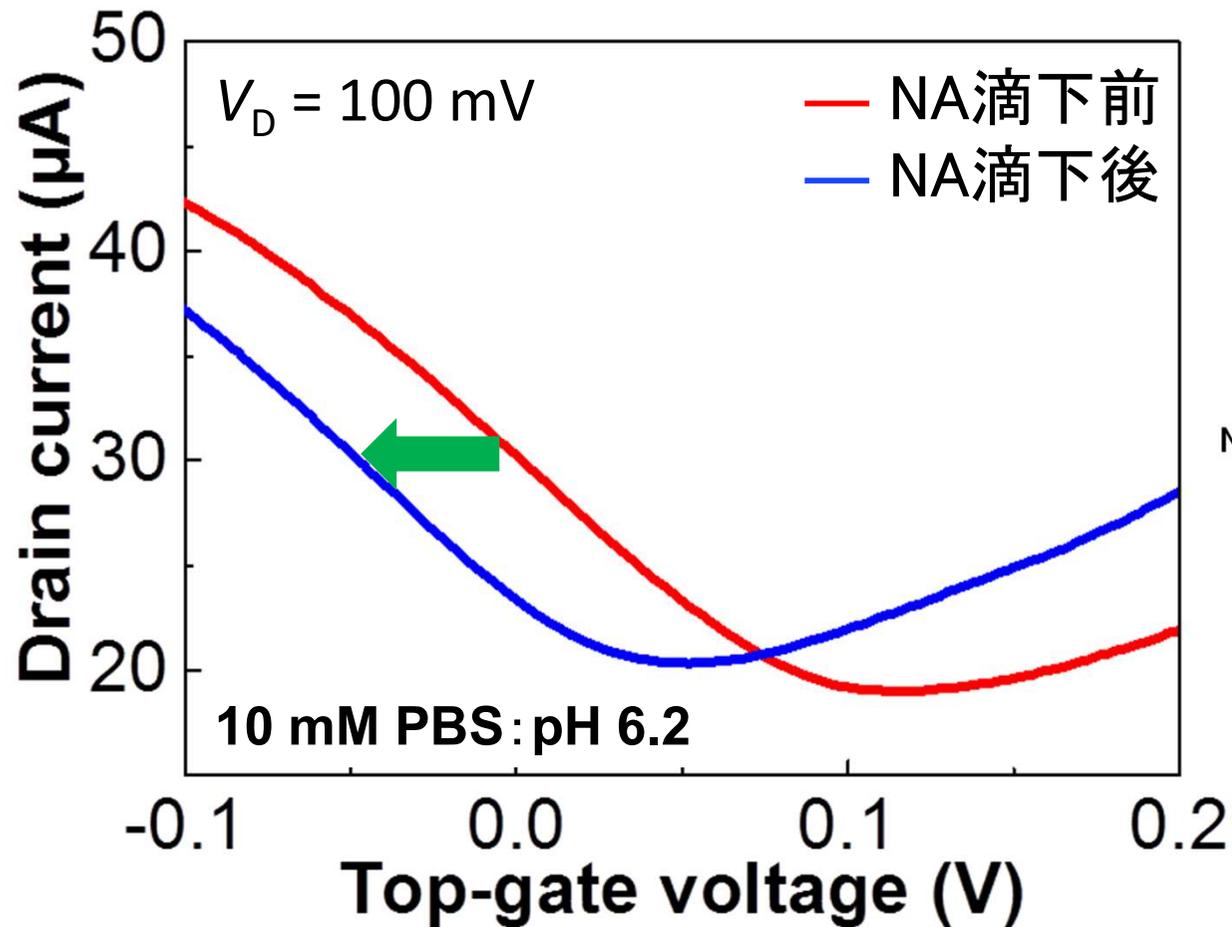


カルボキシル基の電離
→ 負電荷 -

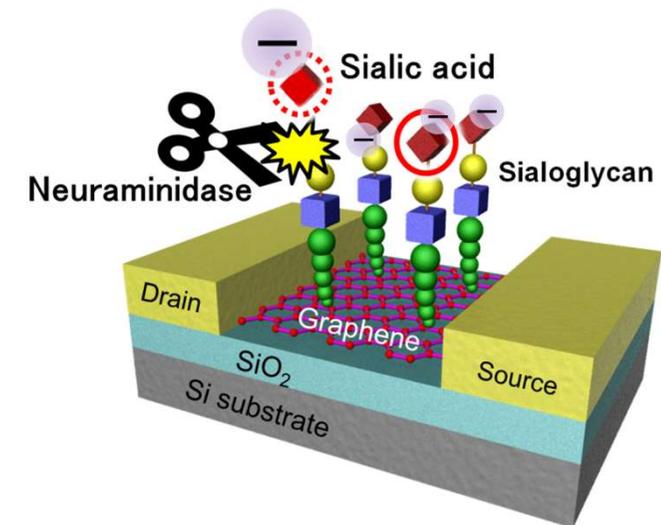


目的 糖鎖機能化G-FETを用いて、NAの反応とその阻害の様子を電氣的に計測

ノイラミニダーゼ添加による伝達特性の変化



ノイラミニダーゼ (NA)
終濃度 200 nM

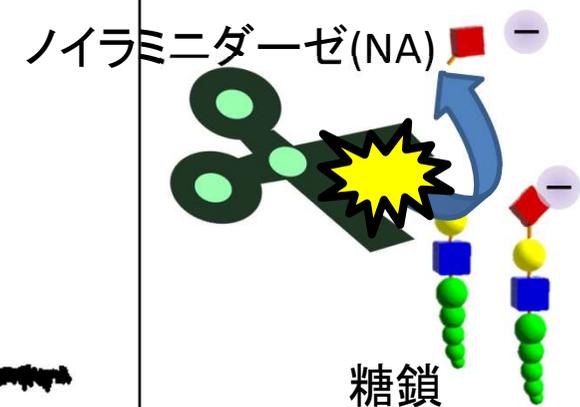
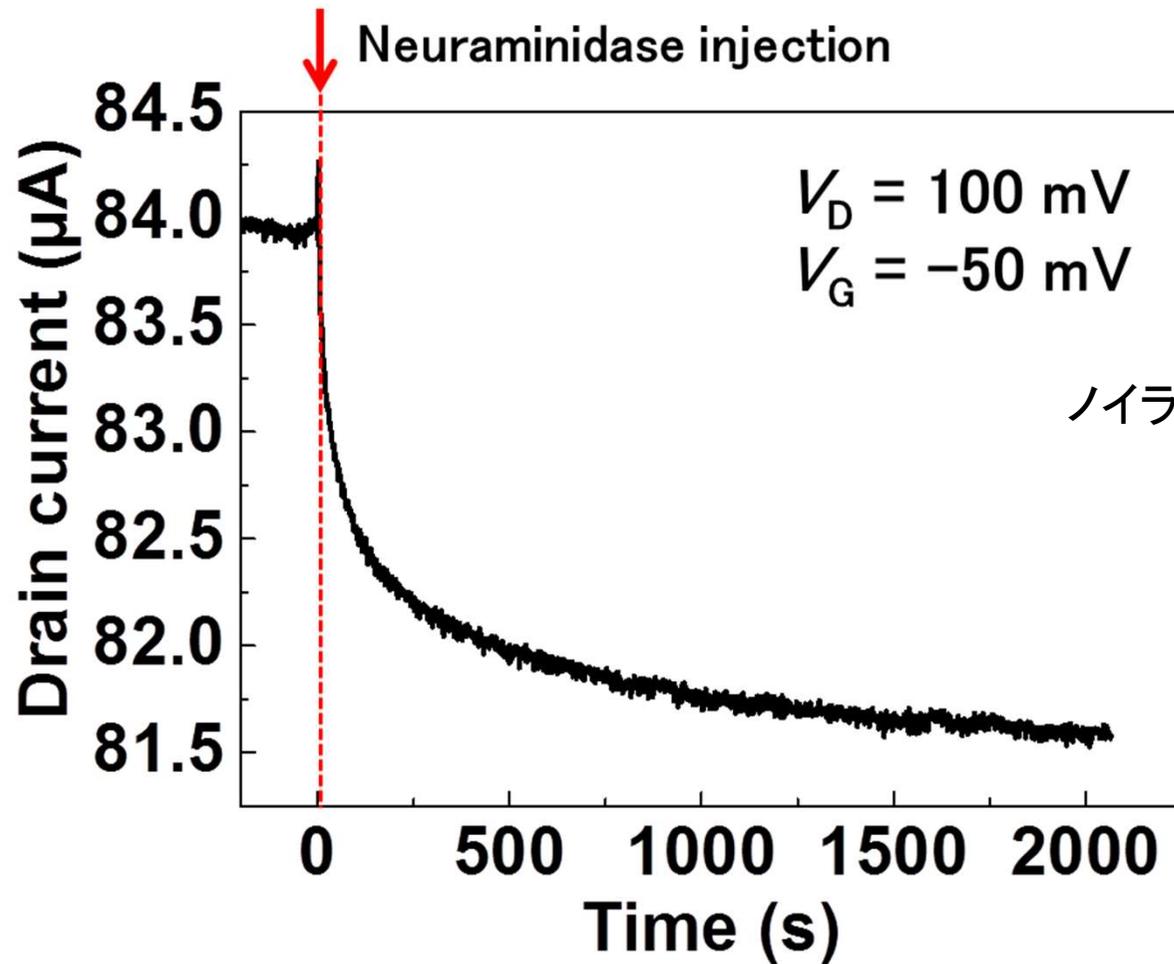


シアル酸の負電荷遊離より負方向へシフト

NA反応の電流値モニタリング

p型領域でゲート電圧固定

細菌由来のノイラミニダーゼ



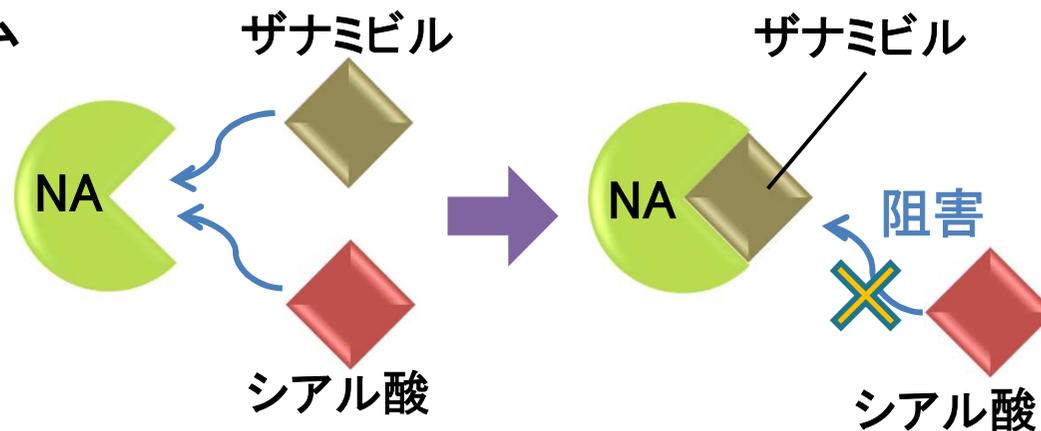
電流値が指数関数的に減少した

糖鎖機能化G-FETを用いた抗ウイルス薬評価

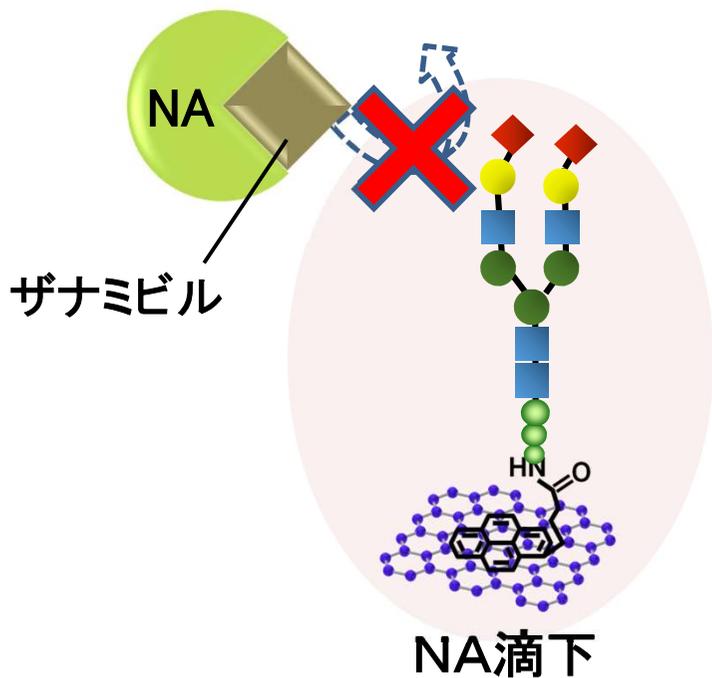
抗ウイルス薬の作用メカニズム



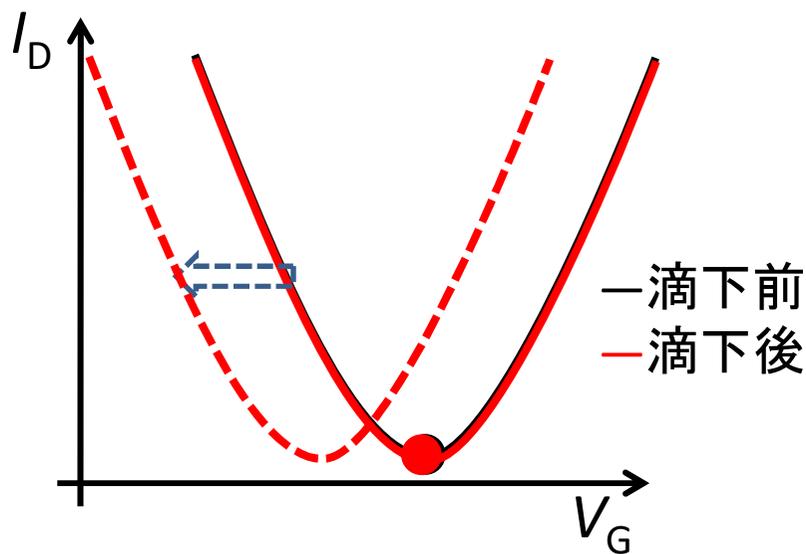
リレンザ®
(ザナミビル)



シアル酸に類似した構造を持ち
シアル酸の代わりにNAの反応部位に結合

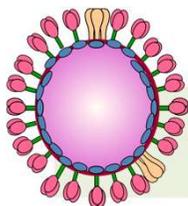
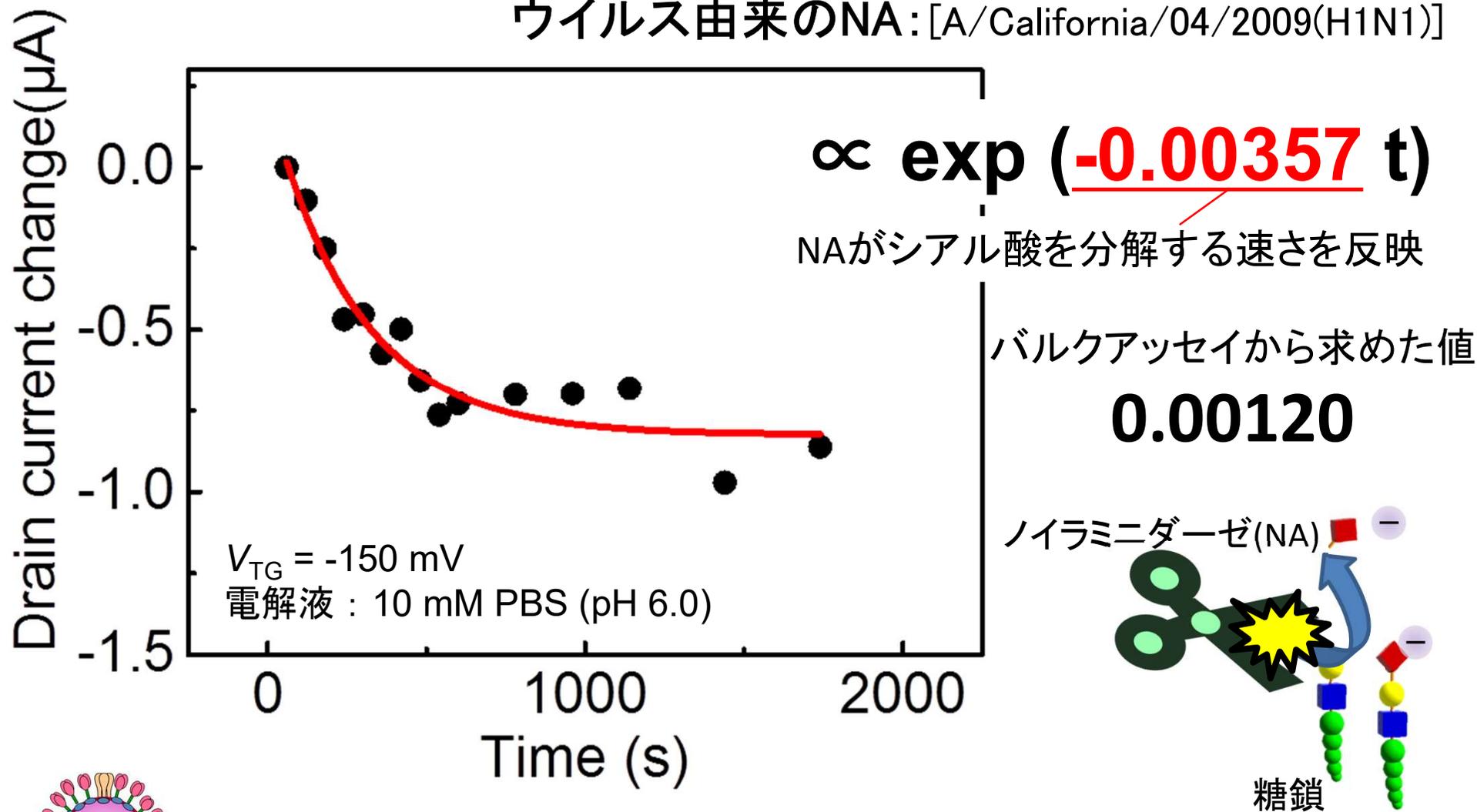


ザナミビル有り(NA阻害)



ウイルス由来NAによる反応の電流値モニタリング

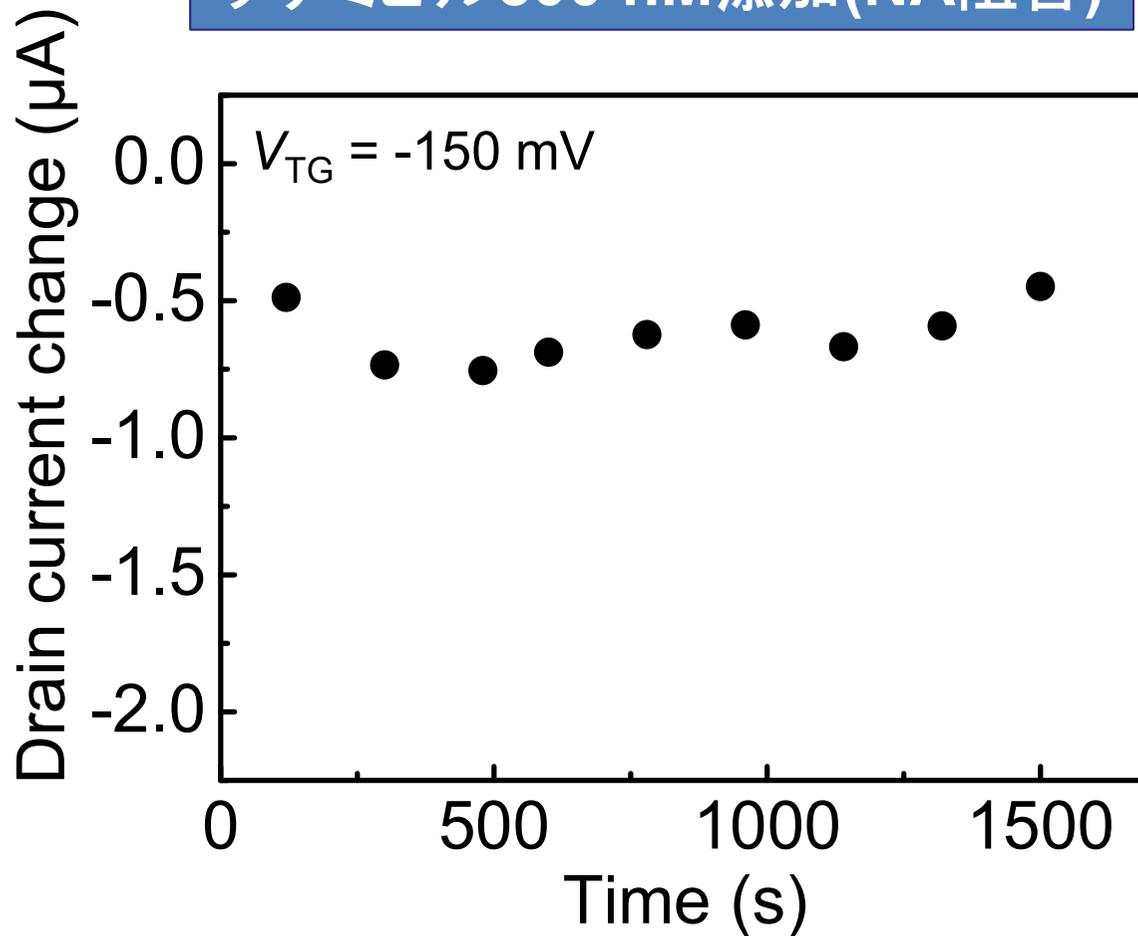
ウイルス由来のNA: [A/California/04/2009(H1N1)]



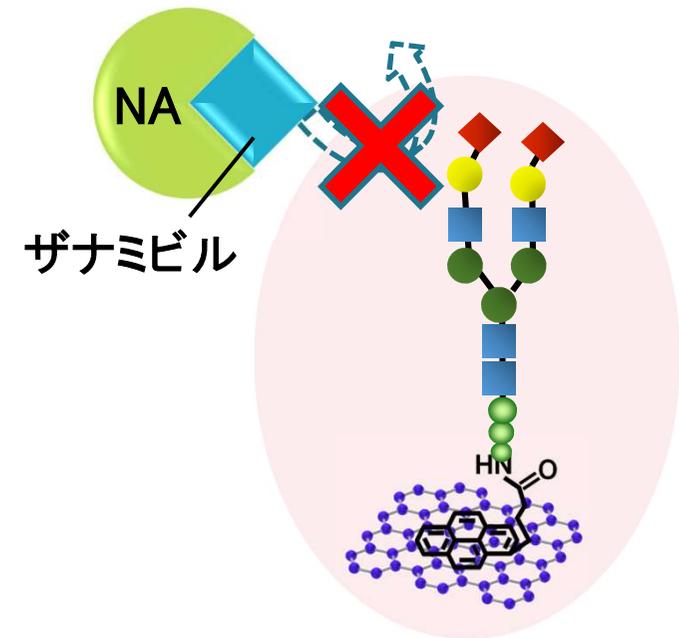
ウイルス由来のNAの反応をG-FETでモニタリング

抗ウイルス薬の評価

ザナミビル500 nM添加(NA阻害)



電荷の変化なし

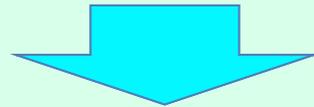


電解液: 10 mM PBS
(pH 6.0, 0.1% Tween20)

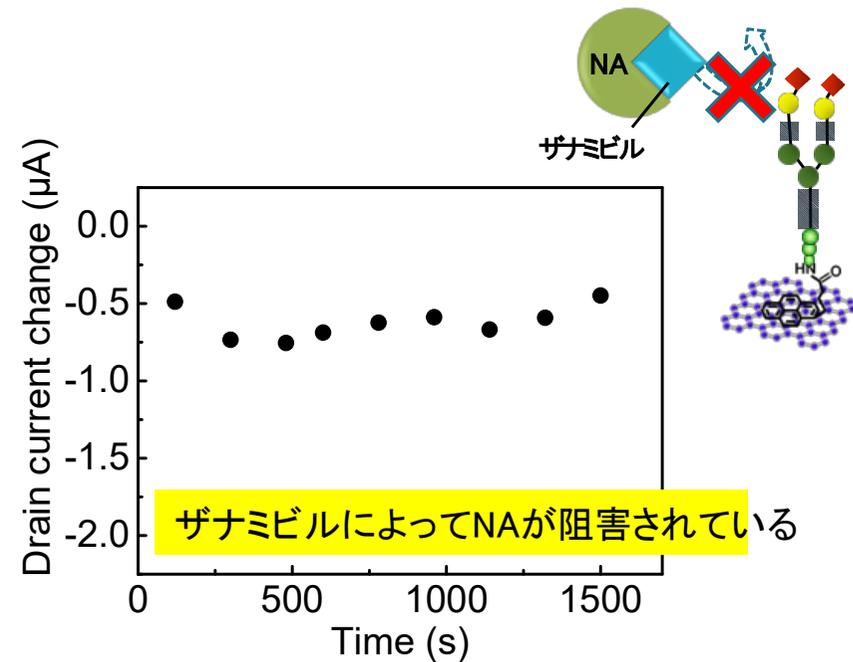
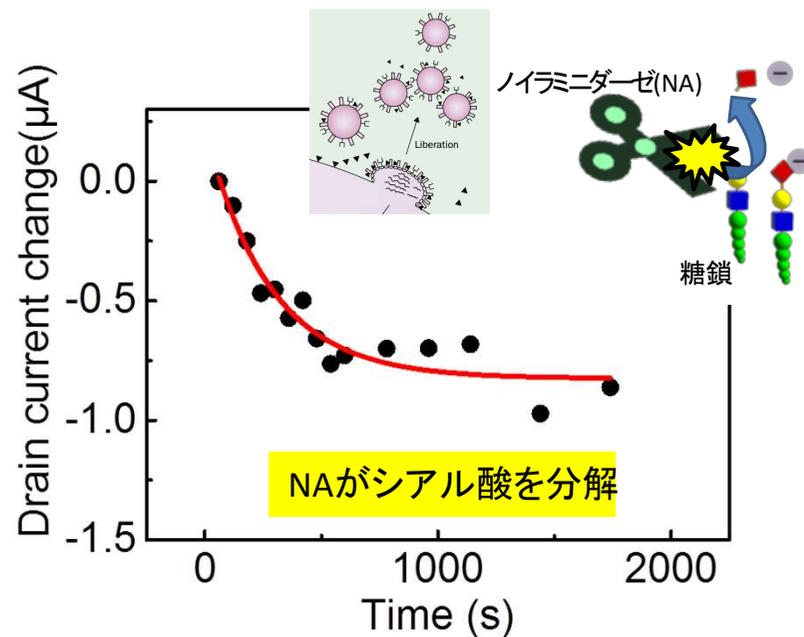
ザナミビルによってNAが阻害されている

得られたポイント

抗ウイルス薬の評価を、初めて電氣的に簡便に可能にした

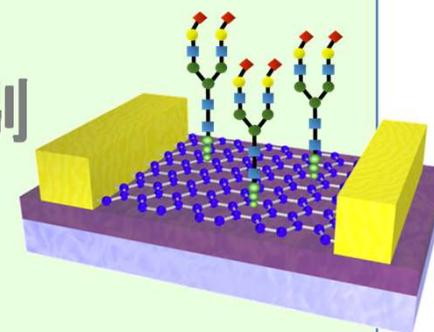
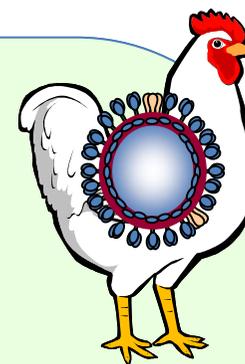


薬剤耐性を有する新種ウイルスの判定に威力



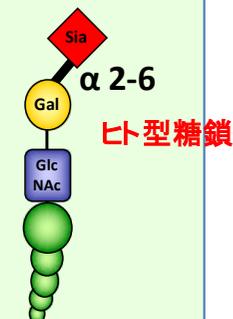
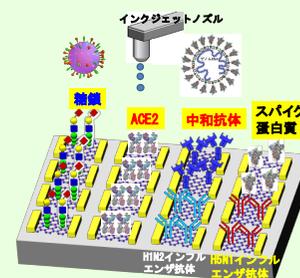
内容

1. 背景：鳥インフルエンザの脅威と問題点
2. グラフェンFETによるヒト感染性の判別
3. グラフェンFETによる薬剤評価の開発



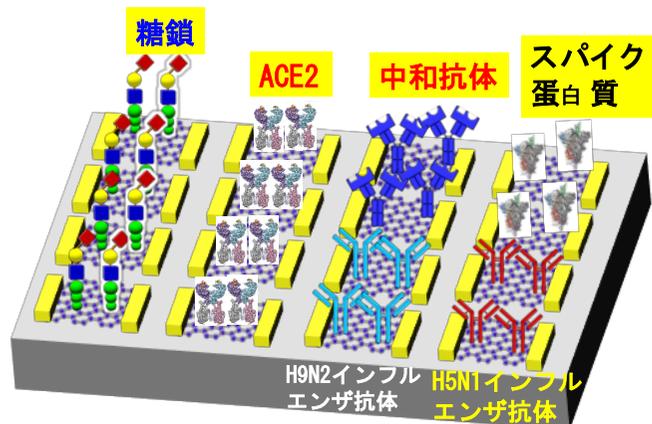
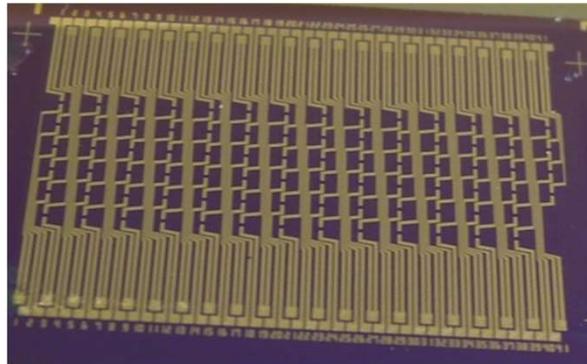
4. 今後の展開

- ・ 多項目, 簡易診断システムへの展開
- ・ 新型コロナウイルスへの展開

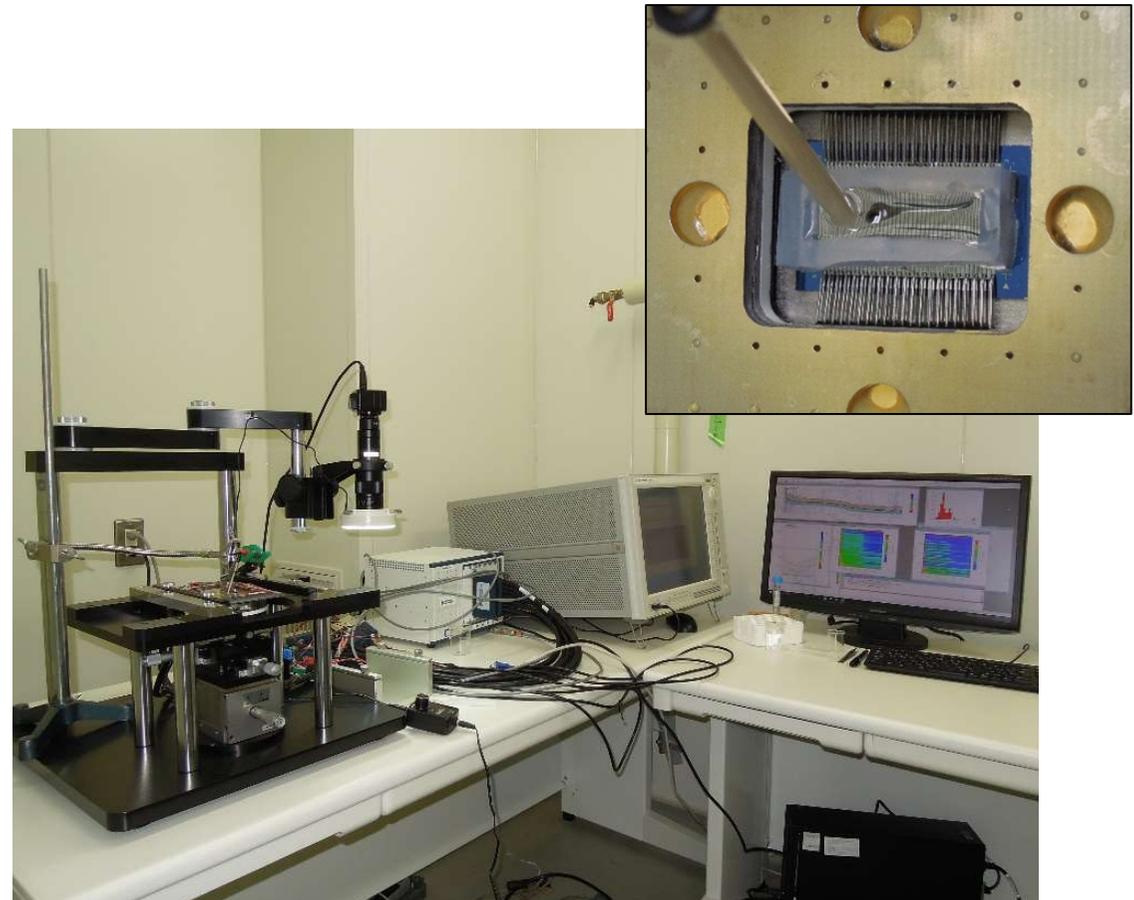


同時多点計測システムの構築

- CVD合成グラフェンを82FETの集積化
- 多点プローバによる同時多点計測システム
- 多項目のレセプターを修飾



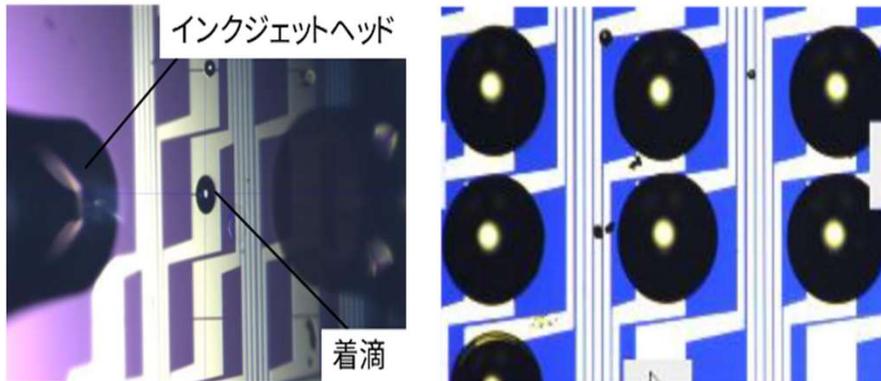
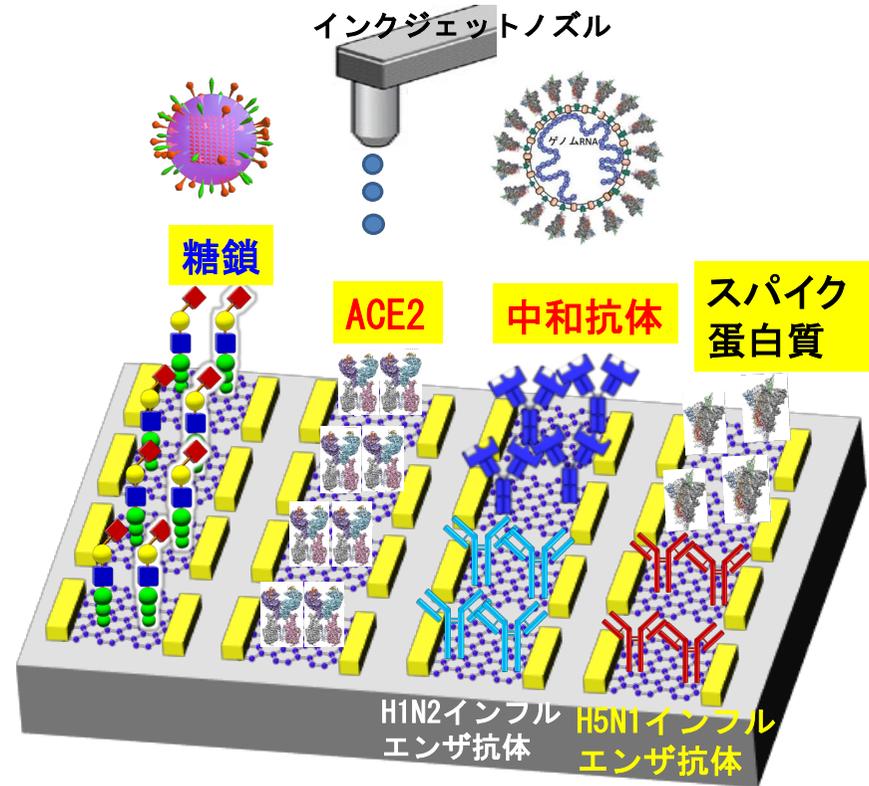
多項目のレセプターを修飾



バイオインクジェットによる多項目のレセプターの修飾方法



バイオインクジェット



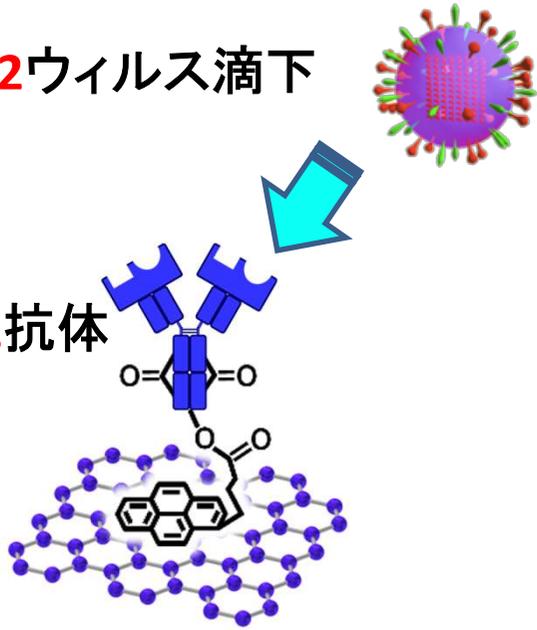
バイオインクジェットによる微小パターンニング

- ACE2
- 中和抗体
- スパイク蛋白
- 糖鎖
- インフル H1N1抗体
- インフル H9N2抗体

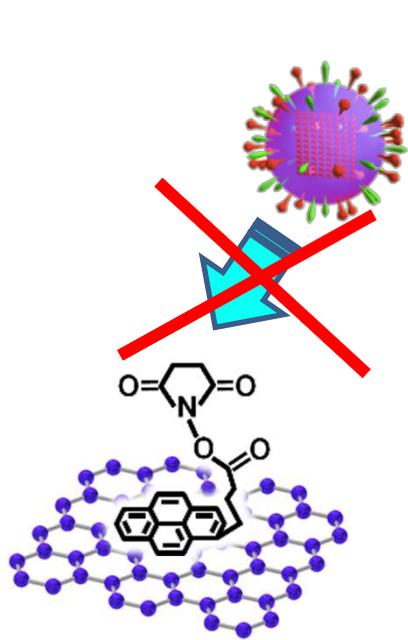
蛍光顕微鏡によるGFETチャンネル上の抗体修飾有無とウイルス結合性

H9N2ウイルス滴下

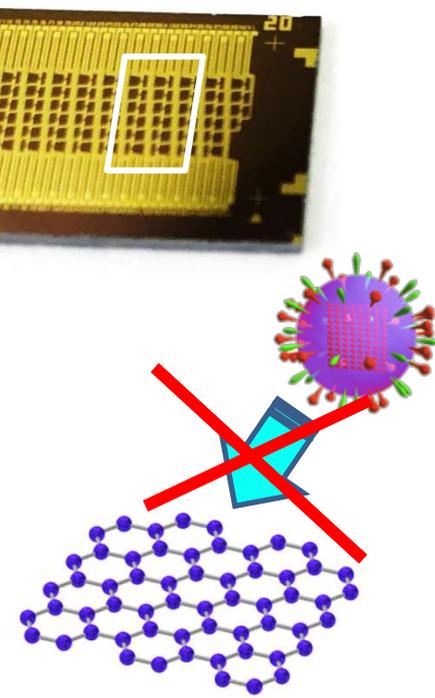
H9N2抗体



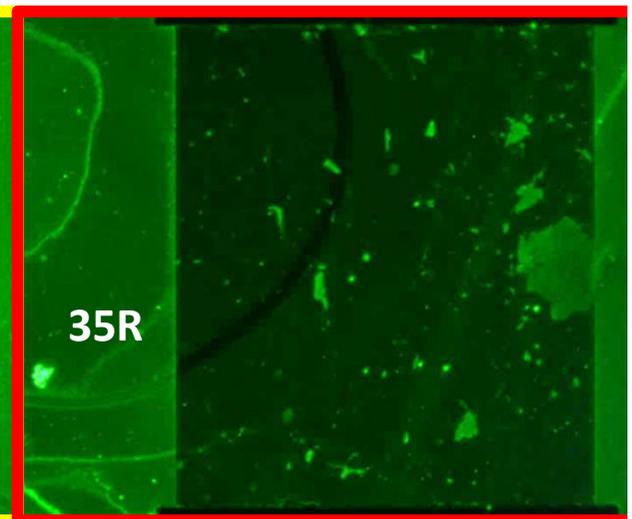
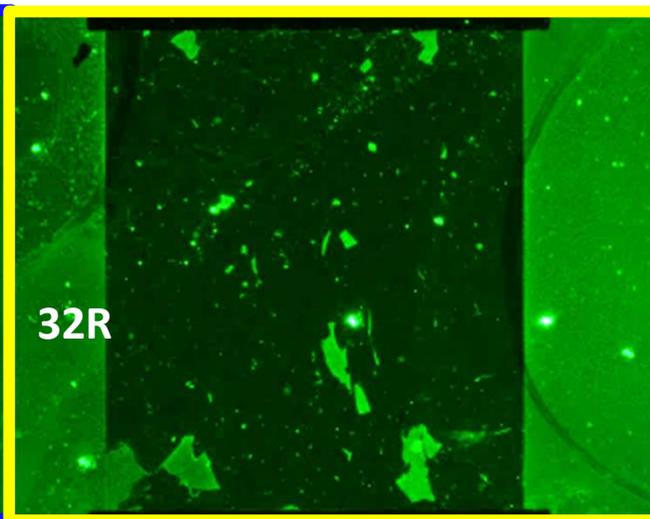
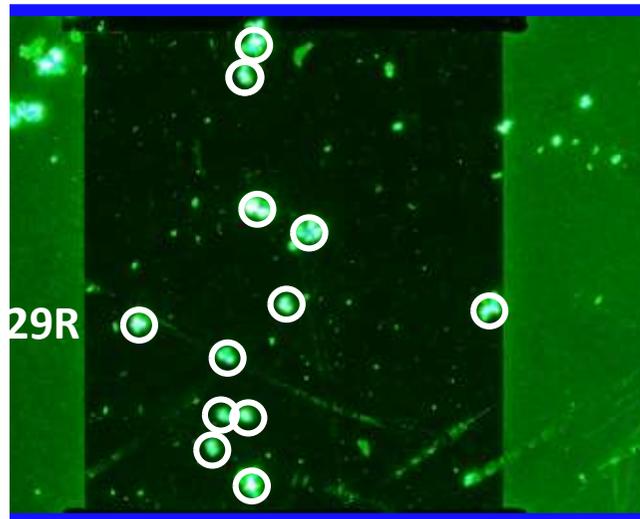
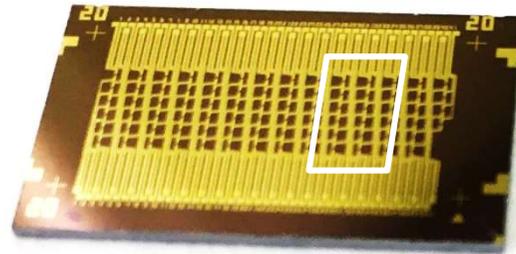
抗体+PBASE



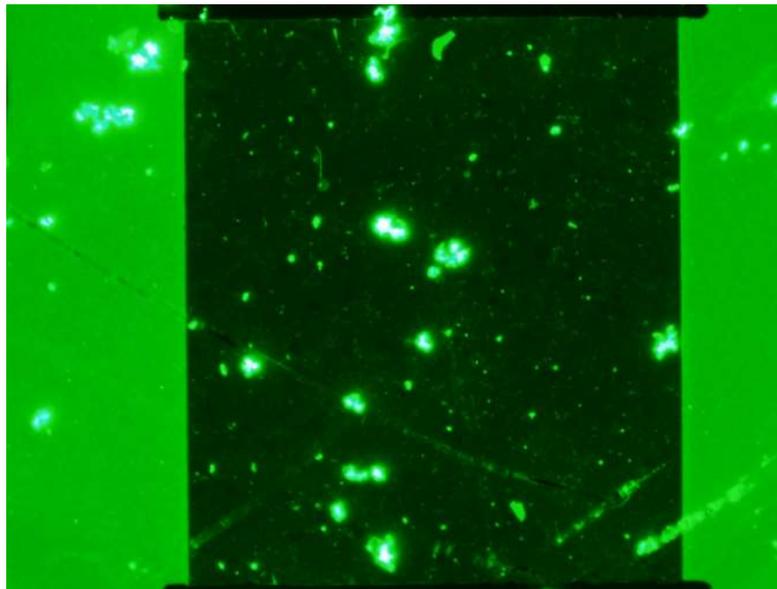
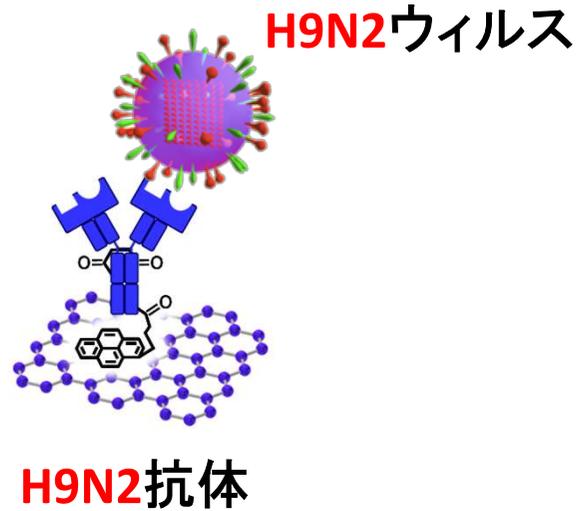
PBASE



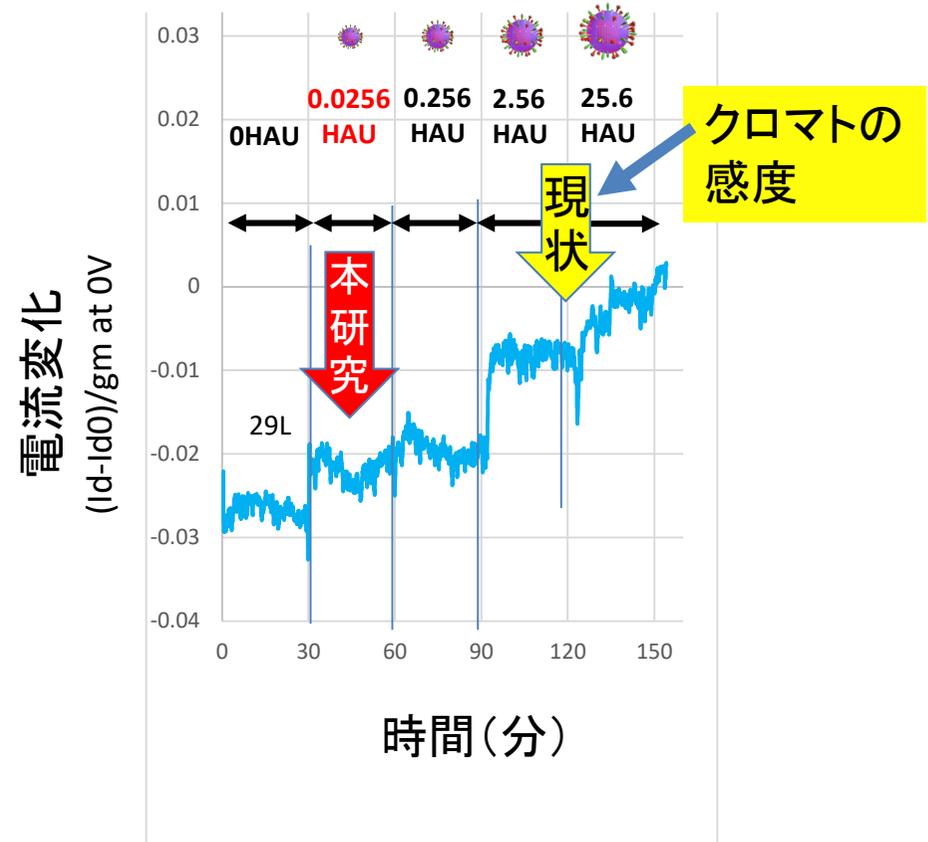
Bare (非修飾)



ウイルスの蛍光顕微鏡像と電流変化特性



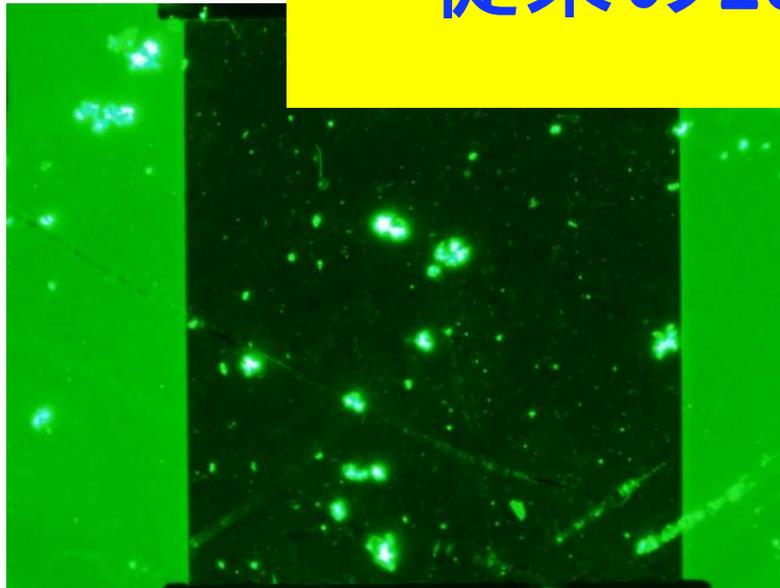
ウイルスの濃度変化



ウイルスの蛍光顕微鏡像と電流変化特性

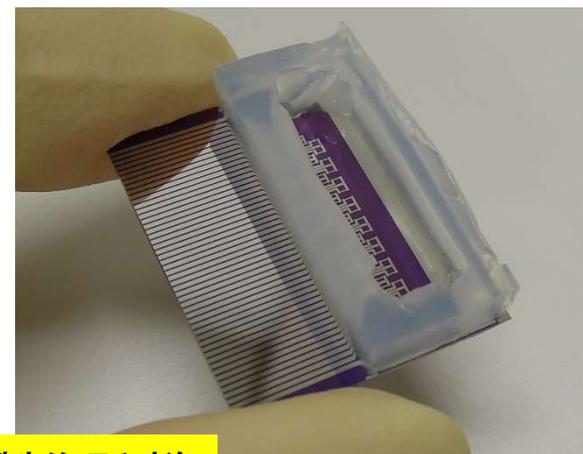
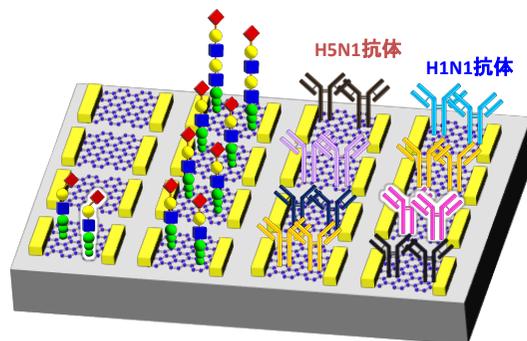
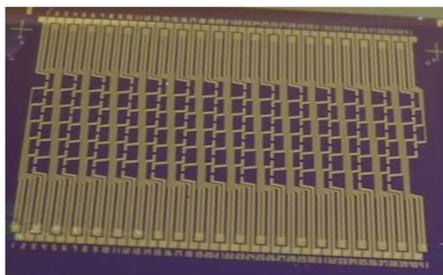
H9N2ウイルス

- 場所選択的に修飾可能
- 0.0256HAUで反応
- 従来の100~1000倍高感度

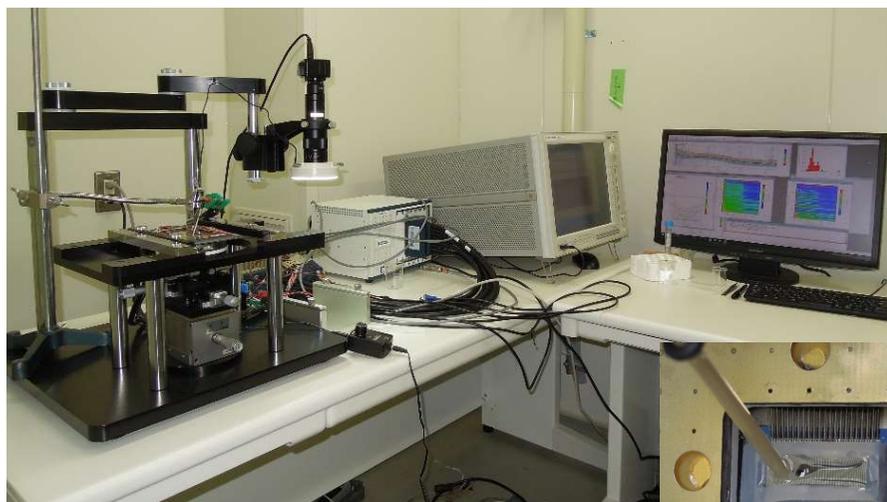


同時多点計測システムのポータブル化

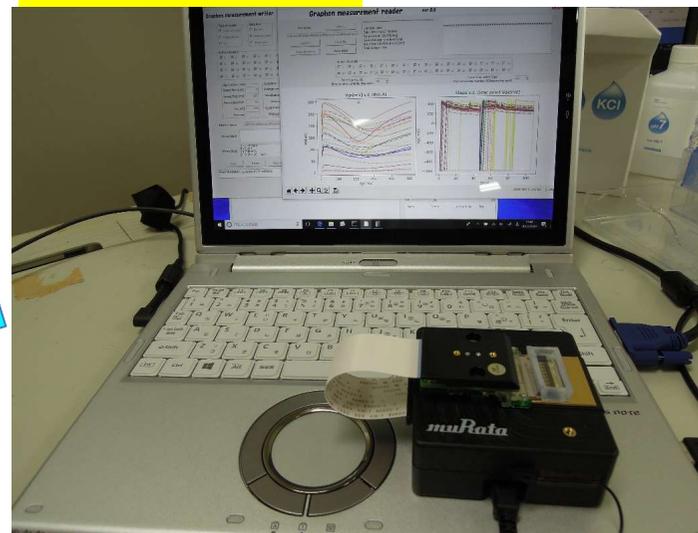
- CVD合成グラフェンを82FETの集積化
- 多点プローバによる同時多点計測システム
- 測定の歩留まり、再現性が格段に向上



村田製作所様



同時多点計測システム



ポータブル機測定系

- 1) ポータブルシステム
- 2) パソコン

エジプトで現地試験！！



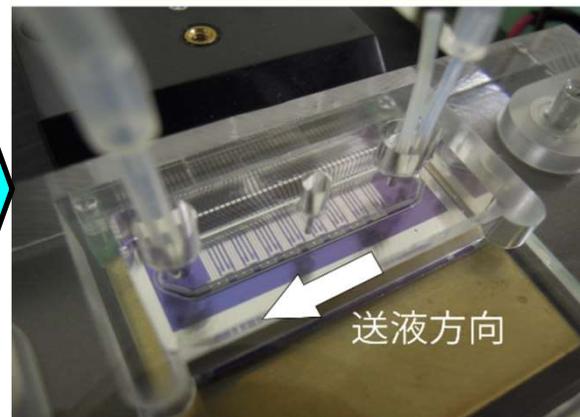
ポータブル検出器の改良／高度化

測定装置の μ TAS化と自動化

ポータブル計測システム



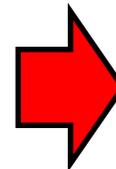
流路の μ TAS化



自動測定システムへ

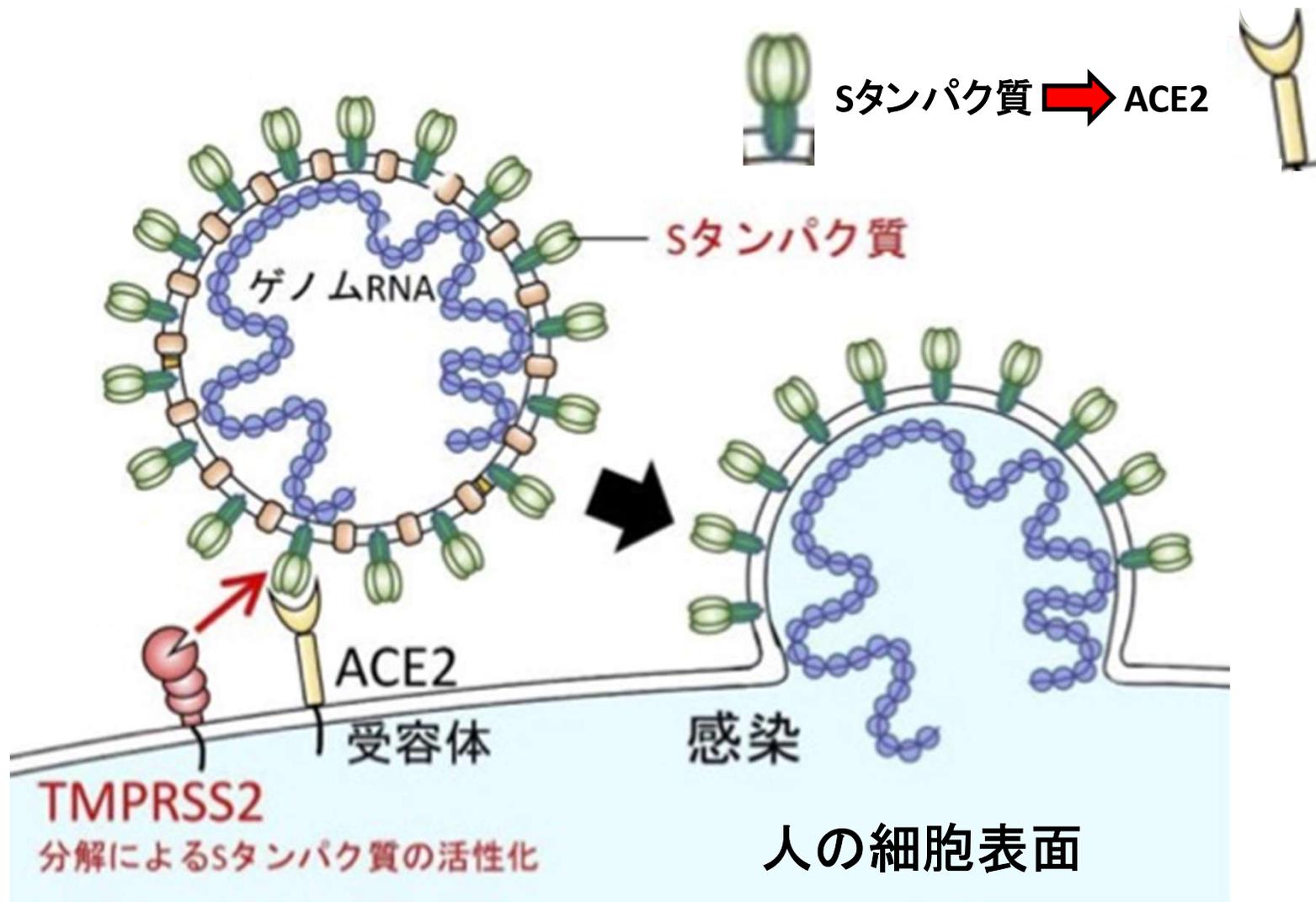


- 試料導入量の定量化
- 洗浄回数の定量化
- 測定プロトコルの自動化



- 測定の再現性改善へ
- ばらつき抑制へ

新型コロナウイルスの生体侵入メカニズム

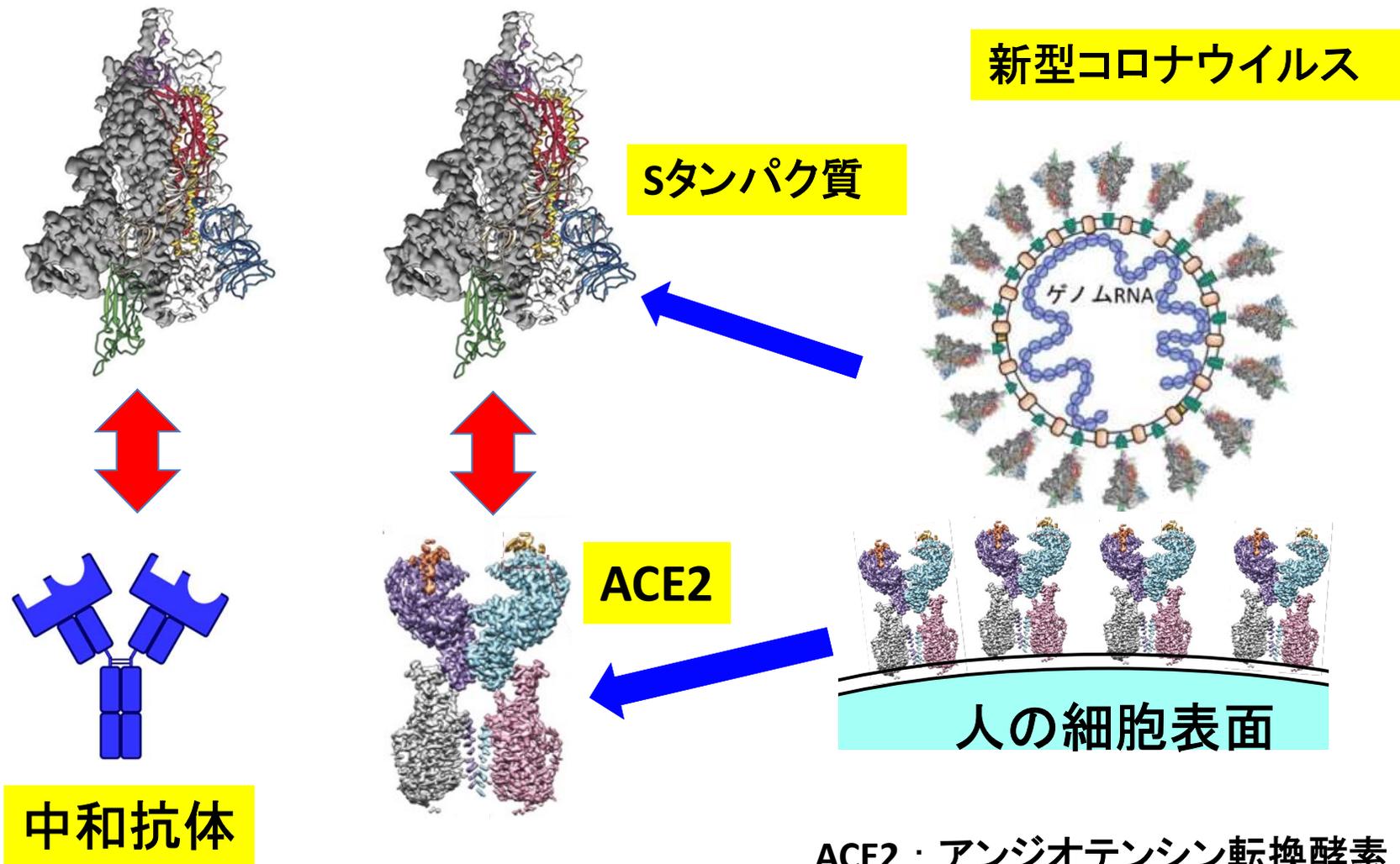


ACE2 : アンジオテンシン転換酵素

井上純一郎他 東京大学医科学研究所

新型コロナウイルスのスパイクタンパク質とACE2が結合

Wrapp et al., Science 367, 1260–1263 (2020) 13 March 2020
National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA.



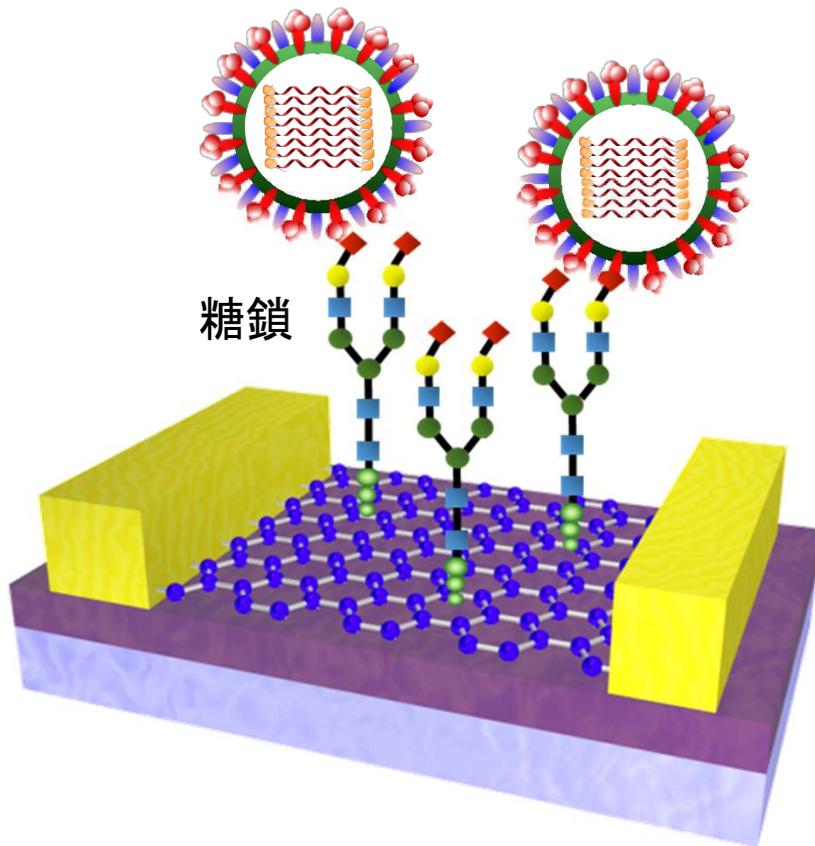
Yan et al., Science 367, 1444–1448 (2020)
27 March 2020 Tsinghua University, Beijing

ACE2 : アンジオテンシン転換酵素

S蛋白質 : スパイクタンパク質

インフルエンザウイルス

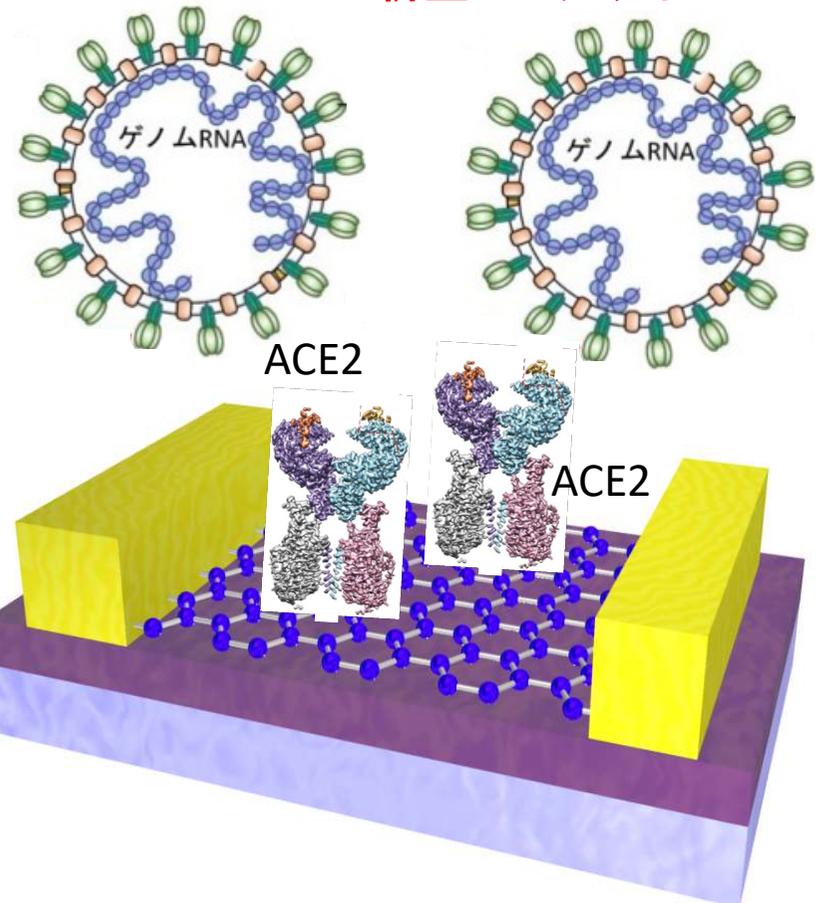
インフルエンザウイルス



糖鎖修飾グラフェンFET

新型コロナウイルス SARS-CoV-2

新型コロナウイルス



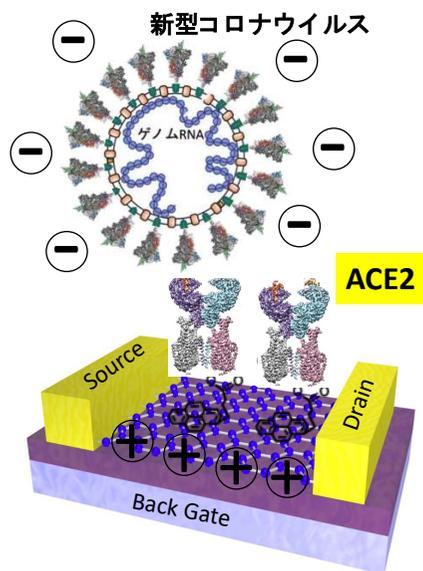
ACE2修飾グラフェンFET

(1) ACE2修飾グラフェンFETによる新型コロナウイルスの検出

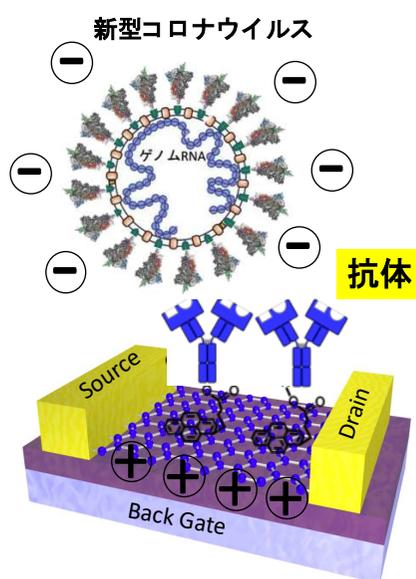
(2) 抗体修飾グラフェンFETによる新型コロナウイルスの検出

(3) スパイク蛋白質修飾グラフェンFETによる中和抗体の検出

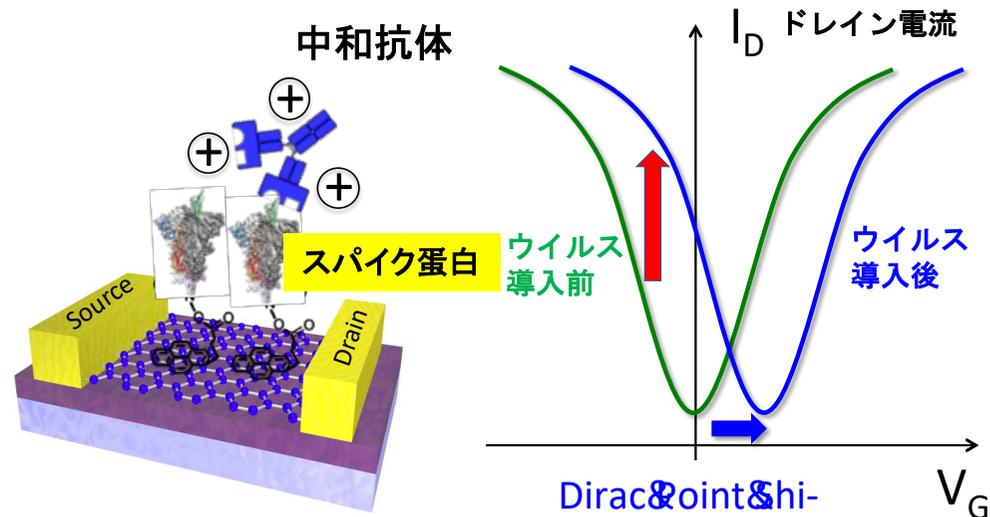
(1)



(2)



(3)



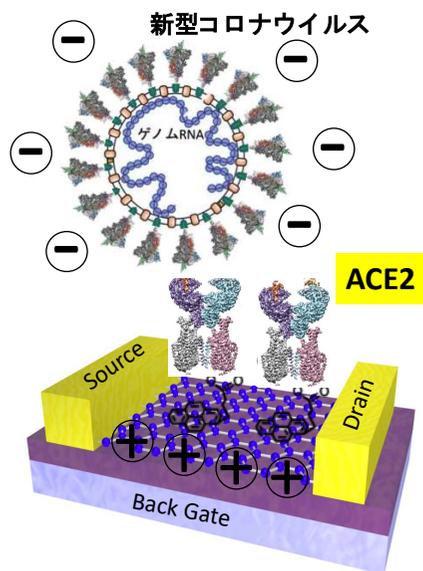
ACE2 : アンジオテンシン転換酵素

(1) ACE2修飾グラフェンFETによる新型コロナウイルスの検出

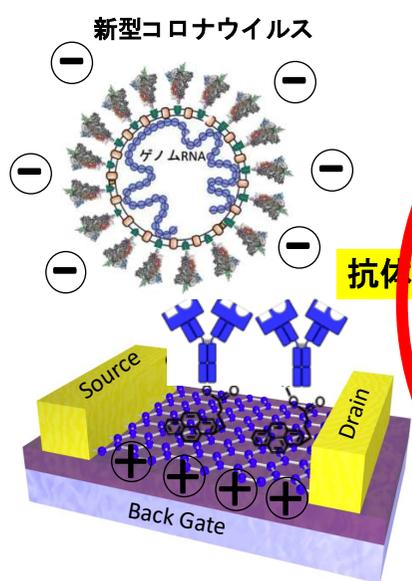
(2) 抗体修飾グラフェンFETによる新型コロナウイルスの検出

(3) スパイク蛋白質修飾グラフェンFETによる中和抗体の検出

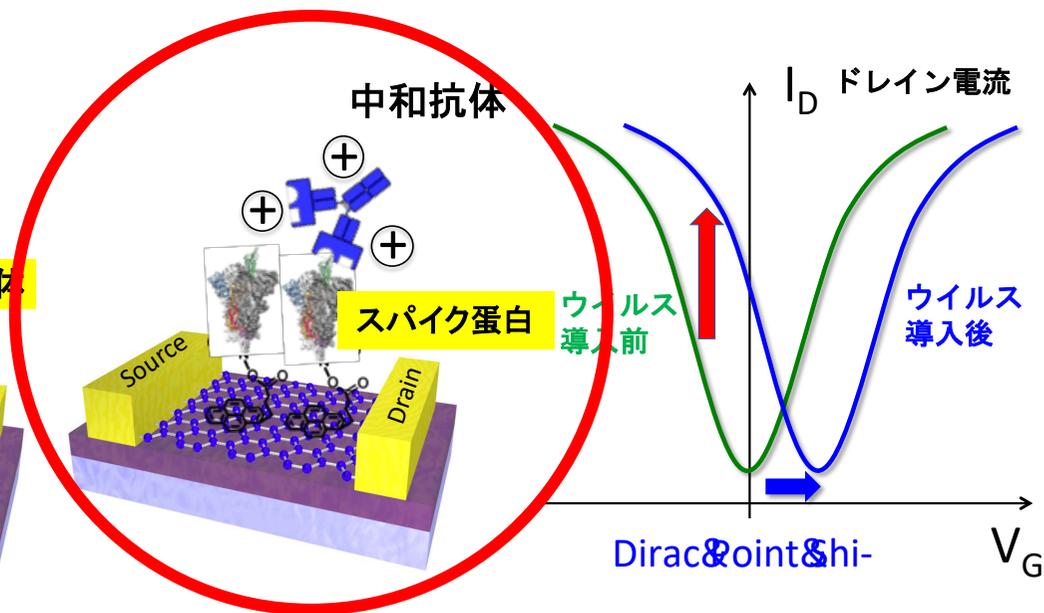
(1)



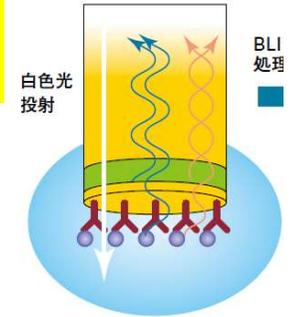
(2)



(3)

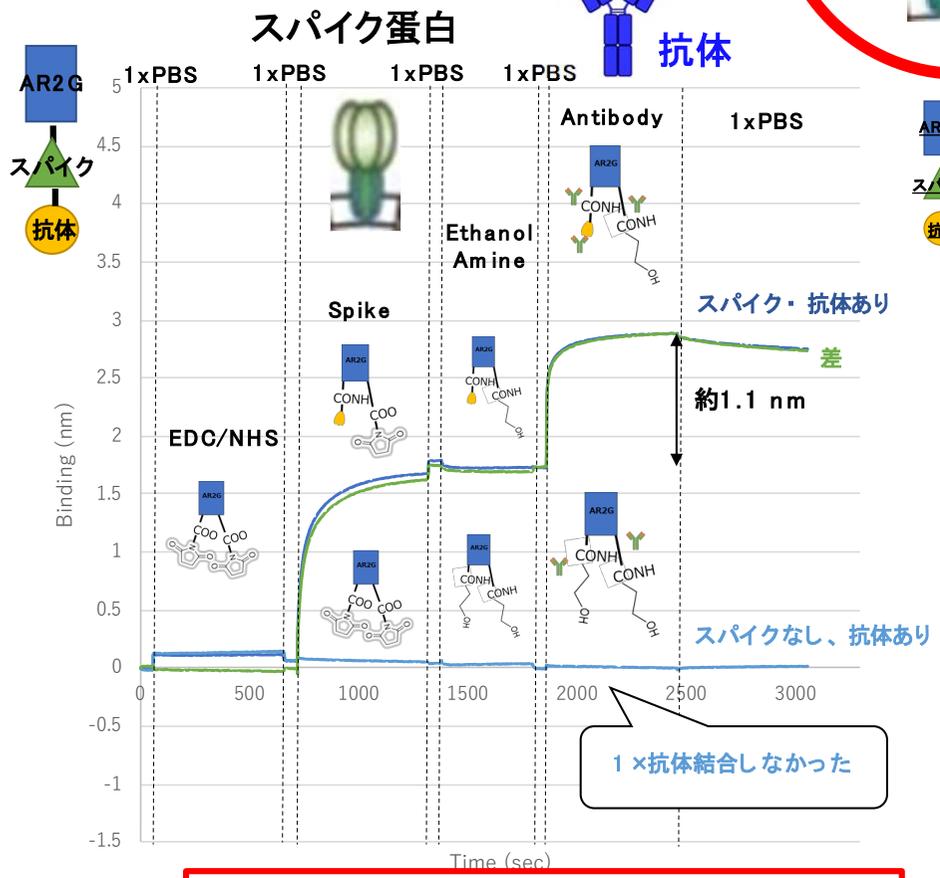


ウイルスのスパイク蛋白質と抗体の結合性確認

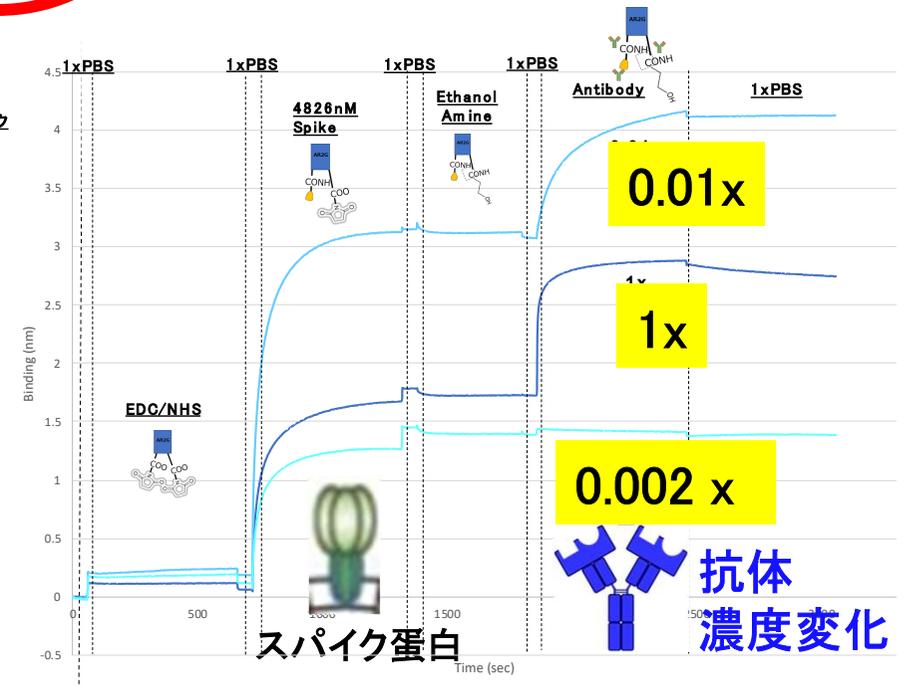


BLITZで確認

BLITZ™ Bio-Layer Interferometry

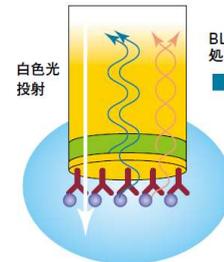


スパイク有無での抗体結合の差



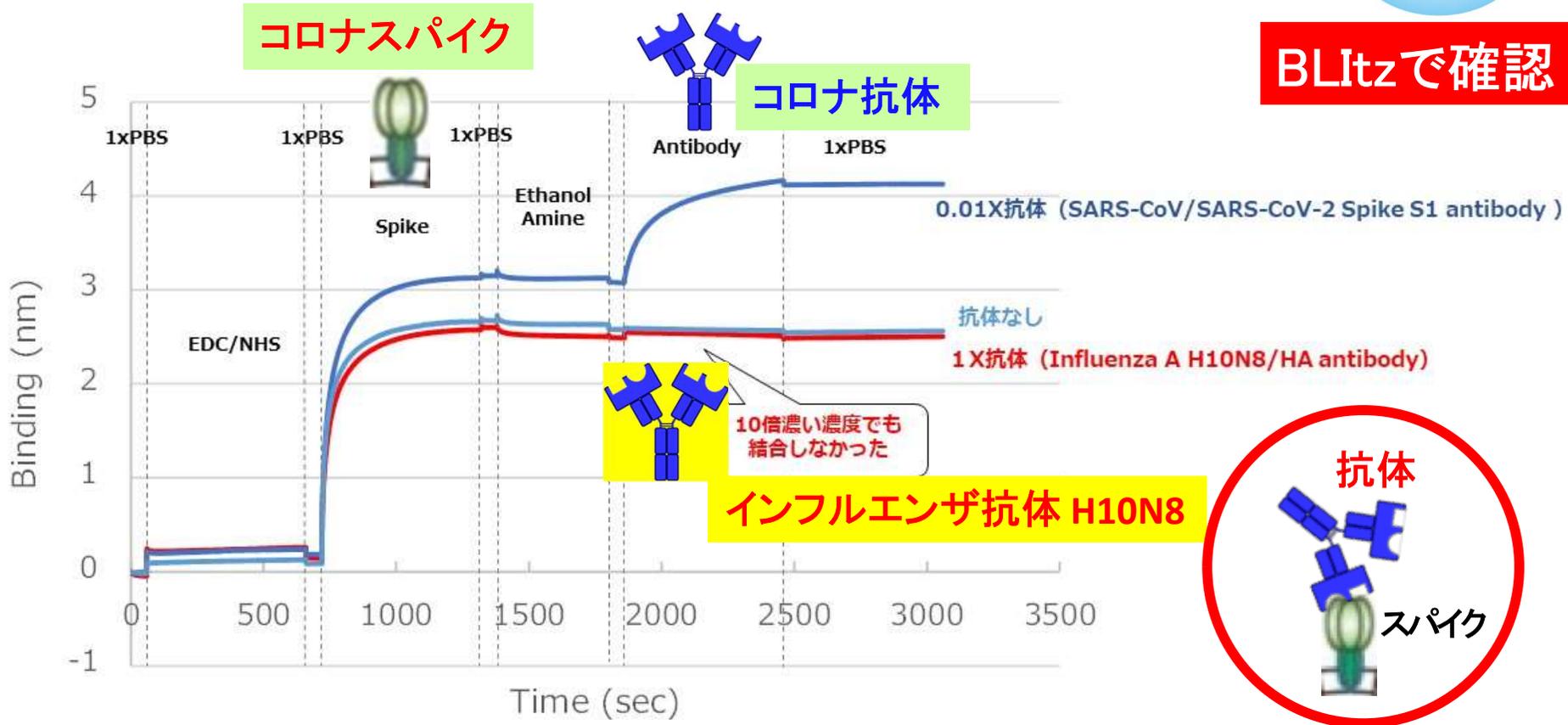
抗体有無での抗体結合の差

コロナスパイク と異なる抗体との選択的結合性



SARS-CoV-2 スパイクタンパクとインフルエンザA H10N8/NA 抗体との結合性確認

BLITZで確認

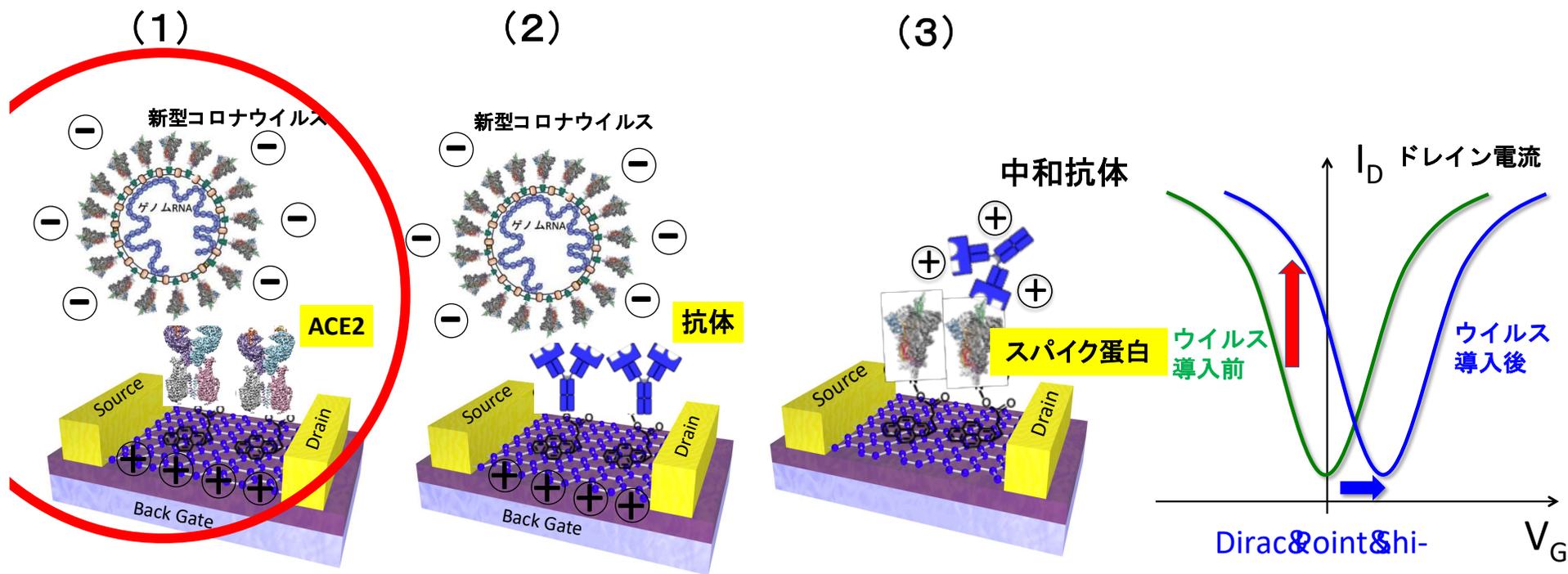


SARS-CoV-2 スパイクタンパクはSARS-CoV-2スパイクタンパクを標的としない抗体とは結合しない

(1) ACE2修飾グラフェンFETによる新型コロナウイルスの検出

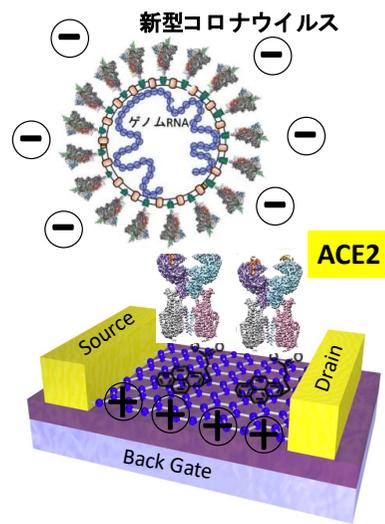
(2) 抗体修飾グラフェンFETによる新型コロナウイルスの検出

(3) スパイク蛋白質修飾グラフェンFETによる中和抗体の検出

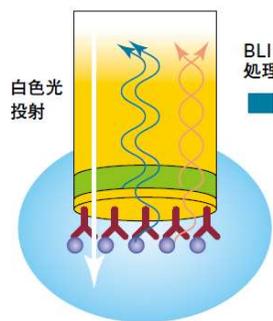


ACE2 : アンジオテンシン転換酵素

スパイクタンパク質による ACE2 の選択的検出

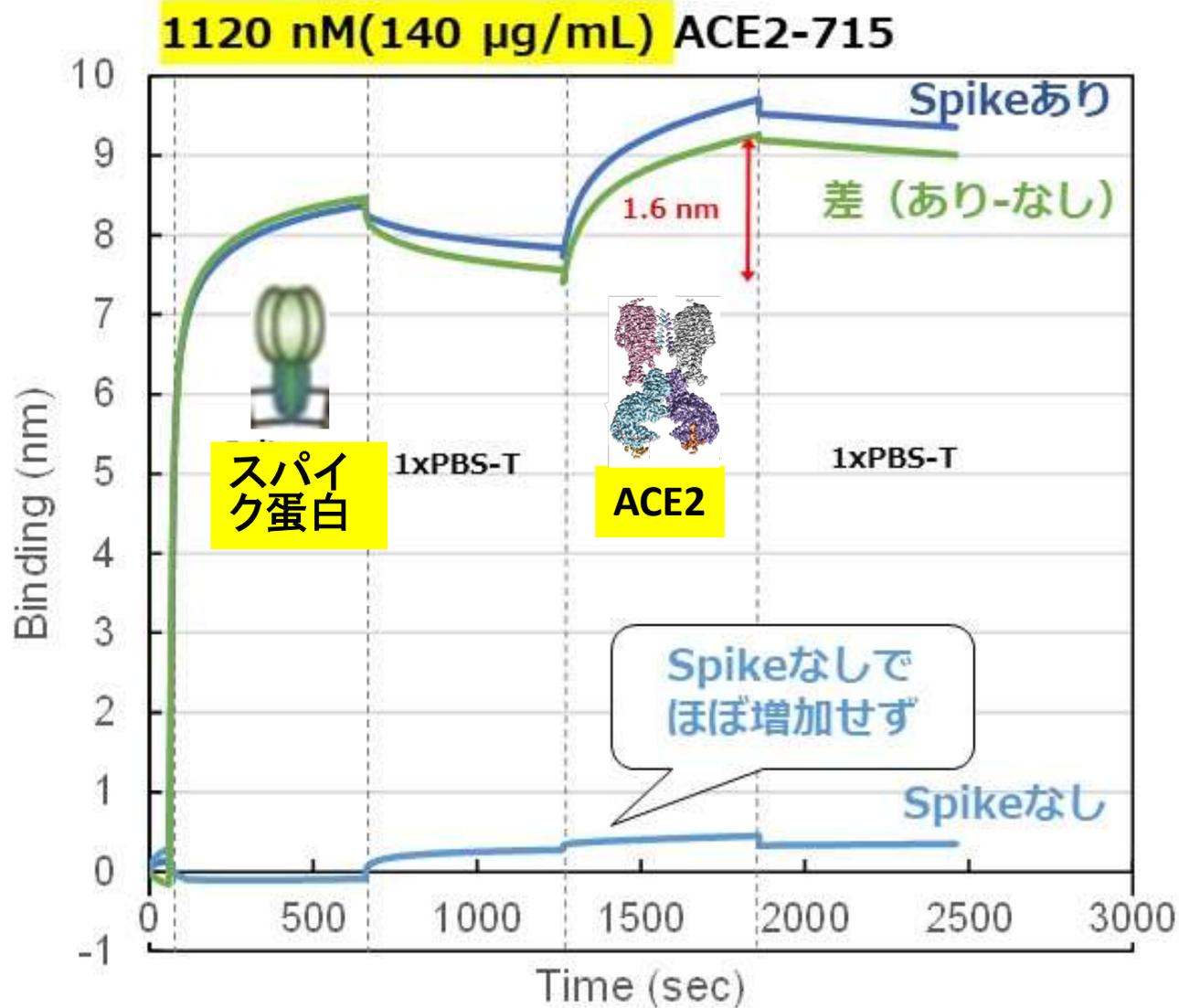


ACE2 の濃度: 1120nM



BLITZで確認

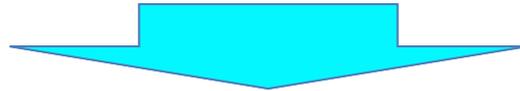
① BLITZ測定結果 (ProA) SpikeとACE2-715



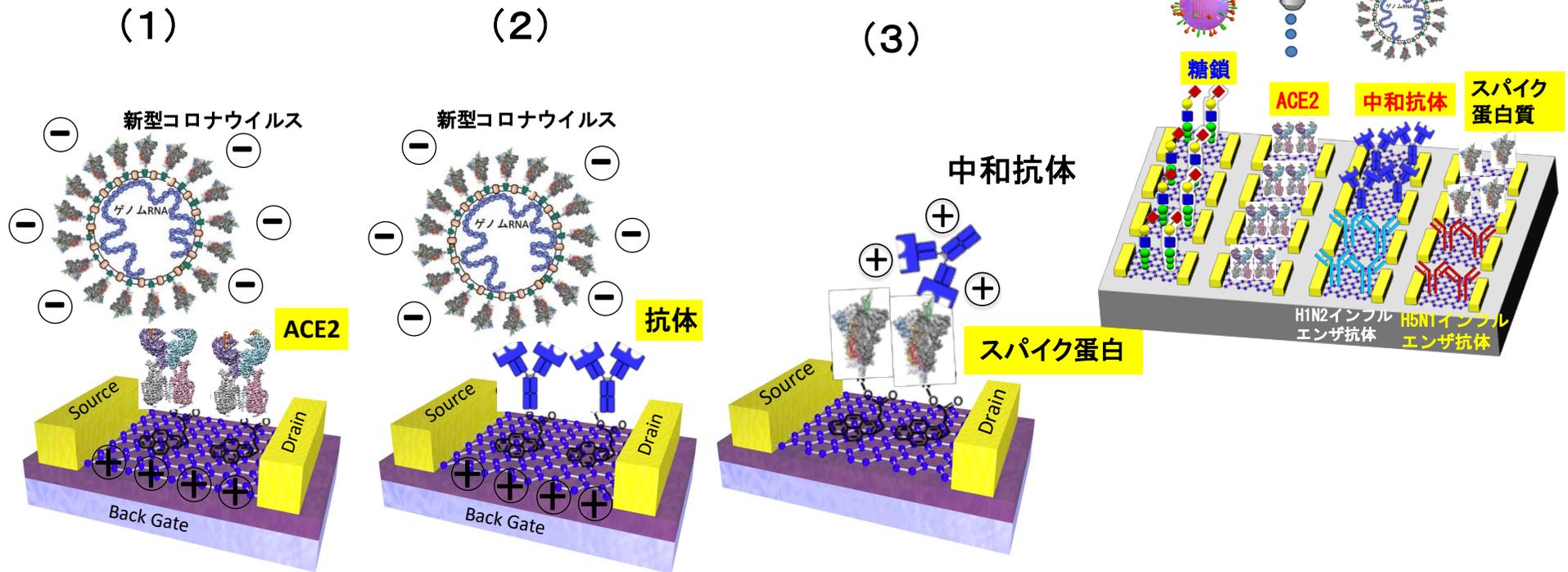
(1) ACE2修飾グラフェンFETによる新型コロナウイルスの検出

(2) 抗体修飾グラフェンFETによる新型コロナウイルスの検出

(3) スパイク蛋白質修飾グラフェンFETによる中和抗体の検出



多項目同時診断の必要性 → 鑑別精度の向上



ACE2 : アンジオテンシン転換酵素

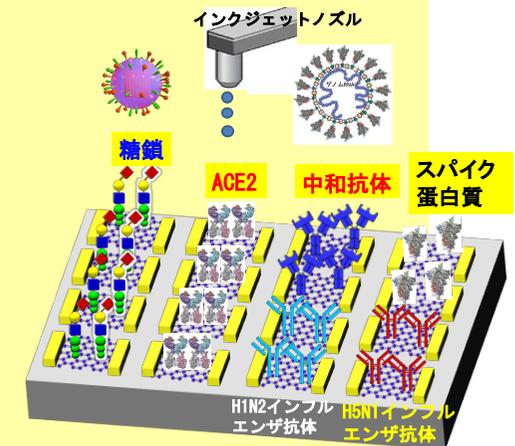
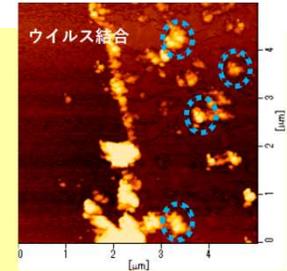
グラフェンFETのアピールポイント

- **超高感度** 従来のクロマト法の**100~1000倍**の感度
- **集積化が可能** **多項目**を同時に測定可能



鑑別精度の抜群の向上

- 極めて**簡便** 誰でもスイッチポンで測定
- **安価** 各家庭に常備可能な値段 体温計のような感覚で常備



将来の展望

様々なウイルスや癌をマーカにより早期に高感度検出

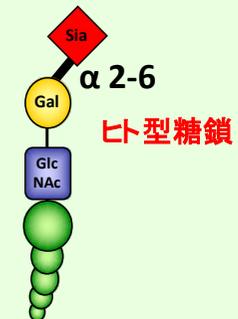
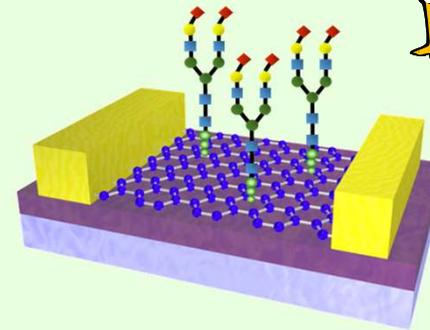
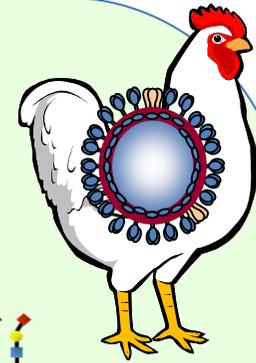
- **季節性インフルエンザの早期発見:**
世界中で年間**20万~60万人**とも言われる季節性インフルエンザ罹患死亡者の大幅低減
- **ノロウイルス:**
年間**数10万**と言われる**低開発国**でのノロウイルスの死亡者の大幅低減
- **膵臓癌:**
早期発見が極めて困難と言われる膵臓癌の早期発見、早期治療が可能に
- **脳腫瘍:**
年間**19万**の脳腫瘍による死亡者の大幅低減
- **コロナウイルス:**
新型コロナウイルスの人感染性を迅速に測定、水際阻止へ

新型コロナ研究についての課題

- 新型コロナの試薬が極めて高価で研究費を圧迫
- 抗体など扱において試料の劣化が著しく、特性やトップデータの再現性、信頼性の確保が困難である。自動化装置の導入が有効だが大学では限界がある。
- 新型コロナ蔓延のためリアル学会、研究会が中止され情報交換が極めて不足。ウェブでは隔靴搔痒で議論が活発にできない。特に海外の情報がリアルに入らない。

まとめ

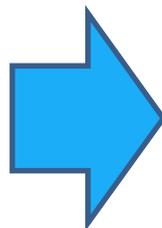
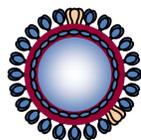
1. グラフェンFETによるヒト感染性の判別
 - ・ 従来の1000倍以上の感度
 - ・ ~20分で計測可能
2. グラフェンFETによる薬剤評価の開発
 - ・ 電氣的に薬剤効果の判定が簡便に可能に
3. システムの実用化を目指した今後の展開
 - ・ ポータブルシステムによる高感度測定
 - ・ 自動計測化への取り組み
4. 多項目, 簡易診断システムへの展開
 - ・ 新型コロナウイルスへの展開



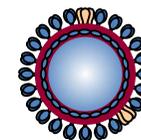
未来社会の診断と治療

研究成果により生み出される
「社会・経済的なインパクト」

現在の診断と治療



本研究で実現する安全な社会



有無や遺伝子型の検知

画一的なタミフル治療

予想に基づく防止措置

特性を直接検知

最適な治療選択

適切な防止措置

正確な情報発信

想定死者5000万人

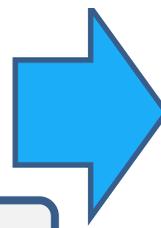


3.6兆ドル損失予測
(世界GDPの5%)



インフルエンザの脅威
を受ける社会

必ずしも効果的でない治療の実施(患者)
耐性/新型ウイルス出現と拡散のリスク(社会)



インフルエンザの脅威
から守られた新しい社会

効果的インフルエンザ治療を即時選択(患者)
耐性/新型ウイルスの封じ込めを実現(社会)